

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



**FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE LOS FACTORES INVOLUCRADOS EN LAS  
MANIFESTACIONES HEMORRÁGICAS DE LA  
TROMBOCITOPENIA INMUNE**

**M<sup>a</sup> TERESA ÁLVAREZ ROMÁN**

**2014**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESTUDIO DE LOS FACTORES INVOLUCRADOS EN LAS**  
**MANIFESTACIONES HEMORRÁGICAS DE LA**  
**TROMBOCITOPENIA INMUNE**

Tesis presentada por **M<sup>a</sup> TERESA ÁLVAREZ ROMÁN** para optar al grado de Doctor por  
la Universidad Autónoma de Madrid

**Directores:**

**Dra. Nora Butta Coll**

Instituto para la Investigación Biomédica  
del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP)  
Hospital Universitario La Paz - IdiPaz  
Madrid

**Dr. Víctor Jiménez Yuste**

Servicio de Hematología y Hemoterapia  
Hospital Universitario La Paz - IdiPAZ  
Profesor Asociado de Ciencias de la Salud  
Departamento de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

**Madrid, 2014**



La Dra. Nora Butta Coll, investigadora del Instituto para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP), Hospital Universitario La Paz - IdiPAZ, y el Dr. Víctor Jiménez Yuste, Jefe del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario La Paz – IdiPAZ y Profesor Asociado de Ciencias de la Salud, Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid,

Certifican que **María Teresa Álvarez Román** ha realizado bajo su dirección el trabajo "ESTUDIO DE LOS FACTORES INVOLUCRADOS EN LAS MANIFESTACIONES HEMORRÁGICAS DE LA TROMBOCITOPENIA INMUNE".

Este trabajo reúne el interés y condiciones suficientes para considerarlo apto para su presentación como tesis doctoral en el Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente escrito en Madrid a 7 de noviembre de 2014.

---

Fdo.: Dra. Nora Butta Coll

---

Fdo.: Dr. Víctor Jiménez Yuste



*A Miguel, sin él nada sería posible*

*A mis padres por transmitirme el entusiasmo por la Medicina*





## Agradecimientos

A mis directores de tesis Víctor y Nora, por la ilusión con la que desde el principio han abordado este proyecto, por su inestimable ayuda y porque su coordinación entre la visión clínica y la de la investigación básica, me ha hecho entender que la medicina traslacional existe.

A Teresa para que vea que todo lo que te propones es posible y que por fin he acabado la tesis. A Laura por su inmenso cariño y su admiración por todo lo que hago.

A mis hermanos porque mis alegrías y mis logros son siempre los suyos.

A mis compañeras y amigas Mónica e Isabel por ayudarme en mi trabajo durante todo este tiempo para que pudiera terminar la tesis.

A Ihosvany por sus ánimos y por su gran ayuda en la minuciosa revisión de este trabajo. A Elena por su colaboración en los experimentos.

A las enfermeras, auxiliares y administrativas que día a día me han ayudado de diversas formas para obtener las muestras.

A “mis pacientes” que desde un primer momento se ofrecieron amablemente a participar en el estudio.

A Ana y a David por su infinita paciencia con la paginación y el encuadernado.

Y a todos aquellos que, de una u otra manera, me han animado y han estado pendientes durante todo este tiempo.



# **ÍNDICE DE MATERIAS**



## Índice de Materias

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>1</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>9</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>15</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>19</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>27</b>
1.1. Plaquetas. Generalidades .....	27
1.1.1.    Producción de las plaquetas. Megacariopoyesis.....	28
1.1.2.    Anatomía de las plaquetas .....	29
1.1.2.1.    Membrana plaquetaria .....	29
1.1.2.2.    Citoesqueleto y citoplasma .....	32
1.1.2.3.    Sistemas membranosos .....	33
1.1.2.4.    Estructuras inespecíficas .....	33
1.1.3.    Plaquetas en la hemostasia: activación plaquetaria.....	34
1.1.4.    Apoptosis de las plaquetas.....	38
1.1.5.    Micropartículas .....	41
1.2. Coagulación. Generación de trombina.....	45
1.2.1.    Hemostasia primaria .....	46
1.2.2.    Hemostasia secundaria .....	46
1.2.3.    Test de generación de trombina (TGT) .....	48
1.3. Trombocitopenia.....	51

1.3.1.	Trombocitopenia de origen central .....	53
1.3.1.1.	Trombocitopenia postquimioterapia .....	53
1.3.1.2.	Trombocitopenia por síndrome mielodisplásico .....	54
1.3.2.	Trombocitopenia de origen periférico. Trombocitopenia inmune (PTI).....	56
1.3.2.1.	Etiopatogenia .....	58
1.3.2.2.	Terminología .....	66
1.3.2.3.	Manifestaciones clínicas .....	68
1.3.2.4.	Diagnóstico.....	68
1.3.2.5.	Tratamiento.....	70
<b>2.</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>81</b>
<b>3.</b>	<b>Objetivo.....</b>	<b>85</b>
<b>4.</b>	<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>89</b>
4.1.	Definición de los pacientes incluidos en el estudio .....	89
4.2.	Criterios para la inclusión y exclusión de los pacientes en el estudio .....	91
4.2.1.	Criterios de inclusión.....	91
4.2.2.	Criterios de exclusión comunes a todos los grupos.....	92
4.3.	Extracción y preparación de las muestras .....	93
4.4.	Análisis de las muestras.....	94
4.4.1.	Recuento de plaquetas.....	94
4.4.2.	Determinación de los niveles de TPO en plasma.....	94
4.4.3.	Determinación de plaquetas inmaduras o reticuladas .....	95
4.4.4.	Determinación de los niveles plasmáticos de APRIL.....	95

4.4.5.	Estudio de la activación plaquetaria .....	95
4.4.6.	Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas .....	96
4.4.7.	Estudio de la actividad procoagulante del plasma .....	97
4.4.8.	Estudio de la actividad procoagulante del plasma asociada a micropartículas (MPs).....	100
4.4.9.	Caracterización del origen celular de las micropartículas.....	101
4.4.10.	Análisis estadístico .....	102
<b>5.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>105</b>
5.1.	Características de los pacientes .....	105
5.1.1.	Pacientes con trombocitopenia central .....	105
5.1.2.	Pacientes con trombocitopenia periférica .....	107
5.2.	Recuento de plaquetas en los distintos grupos experimentales .....	109
5.3.	Estudio de la regulación del número de plaquetas por trombopoyetina en pacientes con PTI y en pacientes con TPC.....	110
5.4.	Estudio de la producción de plaquetas inmaduras en pacientes con PTI y en pacientes con TPC .....	112
5.5.	Estudio de los niveles plasmáticos de APRIL .....	114
5.6.	Estudio de la funcionalidad plaquetaria .....	115
5.7.	Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas .....	118
5.8.	Estudio de la capacidad procoagulante asociada a micropartículas .....	120
5.9.	Caracterización del origen celular de las micropartículas en pacientes con PTI y en pacientes con TPC .....	125

5.10.	Estudio de la capacidad procoagulante del plasma en pacientes con PTI y en pacientes con TPC.....	127
5.11.	Estudio del efecto del tratamiento con agentes estimulantes de la trombopoyesis sobre la hemostasia en pacientes con PTI.....	129
5.11.1.	Características demográficas y datos clínicos de los pacientes incluidos en este estudio .....	129
5.11.2.	Recuento total de plaquetas y de plaquetas inmaduras .....	131
5.11.3.	Efecto de los AR-TPO sobre el APRIL .....	132
5.11.4.	Efecto del tratamiento con los AR-TPO sobre la capacidad procoagulante asociada a MPs y al plasma en pacientes con PTI ...	135
5.11.5.	Efecto del tratamiento con los AR-TPO sobre la expresión del receptor de fibrinógeno en la superficie de las plaquetas y su activación en pacientes con PTI .....	137
5.11.6.	Efecto del tratamiento con los AR-TPO sobre la expresión de fosfatidilserina en la superficie de las plaquetas y su relación con la capacidad de activación de las plaquetas en pacientes con PTI .....	138
<b>6.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>143</b>
6.1.	Recuento de plaquetas en los distintos grupos experimentales .....	143
6.2.	Niveles de TPO en los diferentes grupos estudiados.....	143
6.3.	Plaquetas inmaduras o reticuladas en las trombocitopenias de las diferentes etiologías.....	145
6.4.	Niveles plasmáticos de APRIL .....	146
6.5.	Características funcionales de las plaquetas en los grupos de estudio .....	146
6.6.	Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas .....	148
6.7.	Capacidad procoagulante asociada a micropartículas.....	149



6.8. Caracterización del origen celular de las micropartículas en las diferentes poblaciones estudiadas .....	150
6.9. Capacidad procoagulante del plasma en pacientes con PTI o con TPC .....	151
6.10. Efecto del tratamiento con AR-TPO sobre la hemostasia en pacientes con PTI .....	152
6.10.1. Valoración de la eficacia .....	152
6.10.2. Efecto sobre la función plaquetaria y la actividad procoagulante .	152
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>159</b>
<b>8. Referencias .....</b>	<b>163</b>
<b>9. Publicaciones.....</b>	<b>173</b>
<b>10. Premios.....</b>	<b>187</b>







# **ABREVIATURAS**



**Abreviaturas**

AC: Anticuerpos

ADP: Adenosín difosfato

AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

AP: Altura del pico

APRIL: Ligando Inductor de la Proliferación del Linfocito B

ARN: Ácido ribonucleico

AR-TPO: Agonistas del Receptor de la Trombopoyetina

BAFF: Factor Activador de Linfocitos B

BAFF-R: Receptor para el BAFF

BCMA: Antígeno de Maduración de Células B

CD40L: CD40 ligando

CMF: Citometría de flujo

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CPA: Célula Presentadora de Antígenos

CTLA-4: Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico

DXM: Dexametasona

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EPI: Epinefrina

ETP: Potencial Endógeno de Trombina

eTPO: Trombopoyetina endógena

F: Factor

Fc: Fracción constante

FT: Factor Tisular

FcγRs: Receptores para la fracción constante de las Ig

FITC: 5-isotiocianato de Fluoresceína

Fg: Fibrinógeno

FVW: Factor Von Willebrand

GP: Glicoproteína

HLA: Antígeno Leucocitario Humano

HTA: Hipertensión arterial

IAM: Infarto agudo de miocardio

IGIV: Inmunoglobulinas intravenosas

IPSS: Índice Pronóstico Internacional

L: Litro

LB: Linfocito B

LMP: Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva

MEP: Célula Progenitora Mieloide y Eritroide

Min: Minutos

MKs: Megacariocitos

MM: Mieloma múltiple

MPs: Micropartículas

NCI: Instituto Nacional del Cáncer

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAI-1: Inhibidor del Activador del Plasminógeno de tipo 1

PAR-1: Receptor Activado por Proteasa de tipo 1

PBS: Tampón fosfato salino

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas

PE: Ficoeritrina

PFP: Plasma libre de plaquetas



PLs: Fosfolípidos

PMPs: Micropartículas derivadas de plaquetas

PPP: Plasma pobre en plaquetas

PRD: Prednisona

PRP: Plasma rico en plaquetas

PS: Fosfatidilserina

PSGL-1: Ligando Glicoproteico 1 de la P-selectina

PTI: Trombocitopenia Inmune

PTI-A: Pacientes con PTI antes de recibir tratamiento con agonistas del receptor de la trombopoyetina

PTI-Pts normales: Pacientes con PTI con cifra de plaquetas normal

Pts: Plaquetas

rh-TPO: trombopoyetina humana recombinante

R-TPO: receptor de la trombopoyetina

sCD40L: CD40 ligando soluble

Sd: Síndrome

SDF-1: Factor 1 derivado de las células estromales

SER: Sistema retículo-endotelial

SETH: Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia

SMD: Síndrome mielodisplásico

TAP: Tiempo al pico

TAR: Trombocitopenia con ausencia de radio

TCR: Receptor de linfocitos T

TFPI: Inhibidor del Factor Tisular

TGT: Test de Generación de Trombina

Th: linfocitos T colaboradores

TL: Tiempo de latencia

TLR: Receptores *toll-like*

TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .

TO: Tiempo de obturación

TP: Tiempo de Protrombina

TPC: Trombocitopenia de origen central

TPO: Trombopoyetina

TP-PQ: Trombocitopenia postquimioterapia

TP-SMD: Trombocitopenia en pacientes con Síndrome Mielodisplásico

TRAP: Péptido Activador del Receptor de la Trombina

Treg: Linfocito T regulador

TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada

TVP: Trombosis venosa profunda

TXA<sub>2</sub>: Tromboxano A<sub>2</sub>

UCF-GEMM: Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos, Eritrocitos, Monocitos y Megacariocitos.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

# **LISTA DE FIGURAS**



**Lista de Figuras**

Figura 1.	Morfología plaquetaria en reposo y activada .....	30
Figura 2.	Receptores de la membrana plaquetaria .....	31
Figura 3.	Receptor del fibrinógeno .....	37
Figura 4.	Interacciones de las plaquetas en el proceso de la coagulación .....	38
Figura 5.	Cambios implicados en la apoptosis .....	41
Figura 6.	Micropartículas como mediadores de señalización .....	42
Figura 7.	Sistemas implicados en el mantenimiento de la membrana plaquetaria ...	44
Figura 8.	Mecanismo de formación de micropartículas .....	45
Figura 9.	Comparación de la generación de trombina medida entre los test clásicos de la hemostasia y los test globales .....	49
Figura 10.	Destrucción de plaquetas mediada por anticuerpos .....	60
Figura 11.	Interacciones entre las células de la inmunidad innata y los linfocitos B ...	62
Figura 12.	Interacciones entre las células implicadas en la respuesta inmune en los pacientes con PTI .....	64
Figura 13.	Características estructurales de las plaquetas en la apoptosis en pacientes con PTI .....	66
Figura 14.	Trombograma con sus parámetros característicos .....	98
Figura 15.	Esquema de ZYMUPHEN MP-Activity kit .....	101
Figura 16.	Recuento de plaquetas en los diferentes grupos en estudio .....	110
Figura 17.	Niveles plasmáticos de TPO determinados por ELISA .....	111
Figura 18.	Relación entre los niveles plasmáticos de TPO y el recuento plaquetario	111
Figura 19.	Porcentaje de plaquetas reticuladas determinado por CMF .....	112

Figura 20. Relación entre el porcentaje de plaquetas reticuladas y el recuento plaquetario .....	113
Figura 21. Relación entre los niveles plasmáticos de TPO y el porcentaje de plaquetas reticuladas .....	113
Figura 22. Niveles plasmáticos de APRIL .....	114
Figura 23. Relación entre los niveles de APRIL y el recuento plaquetario en los pacientes con PTI .....	115
Figura 24. Unión de PAC1 a la superficie de las plaquetas .....	116
Figura 25. Relación entre el recuento plaquetario y la función plaquetaria .....	116
Figura 26. Expresión del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas.	117
Figura 27. Expresión de P-selectina en la superficie de las plaquetas.....	118
Figura 28. Exposición de fosfatidilserina en la superficie de las plaquetas .....	118
Figura 29. Relación entre la unión de Anexina V a la superficie plaquetaria y el recuento plaquetario .....	119
Figura 30. Relación entre la unión de PAC1 y de Anexina V .....	120
Figura 31. Actividad procoagulante asociada a micropartículas.....	121
Figura 32. Relación entre la actividad procoagulante de las micropartículas y la unión plaquetaria de Anexina V .....	122
Figura 33. Relación entre la actividad procoagulante de las micropartículas y el número de plaquetas.....	123
Figura 34. Relación entre la actividad procoagulante de las micropartículas y la concentración plasmática de APRIL.....	124
Figura 35. Detección del origen celular de las micropartículas.....	125
Figura 36. Relación entre el porcentaje de micropartículas y el recuento celular ....	126
Figura 37. Actividad procoagulante asociada al factor tisular (FT) de las micropartículas .....	127

Figura 38. Test de generación de trombina .....	128
Figura 39. Recuento de plaquetas y porcentaje de plaquetas reticuladas en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder al tratamiento con AR-TPO .....	131
Figura 40. Niveles plasmáticos de TPO en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder al tratamiento con AR-TPO .....	132
Figura 41. Recuento de plaquetas en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder al tratamiento con los AR-TPO o IGIV y con TPC ..	133
Figura 42. Niveles de APRIL en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder a los tratamientos con AR-TPO o IGIV y con TPC .....	134
Figura 43. Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a los niveles plasmáticos de APRIL y el número de plaquetas en los distintos grupos .....	135
Figura 44. Generación de trombina en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder a los tratamientos con AR-TPO .....	136
Figura 45. Capacidad procoagulante asociada a micropartículas en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder a los tratamientos con AR-TPO .....	136
Figura 46. Capacidad de activación del receptor de fibrinógeno en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder a los tratamientos con AR-TPO .....	137
Figura 47. Exposición de fosfatidilserina en la superficie de plaquetas en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder a los tratamientos con AR-TPO.....	138
Figura 48. Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la unión de Anexina V y la unión de PAC1.....	139





# **LISTA DE TABLAS**



**Lista de Tablas**

Tabla 1. GPs de la membrana plaquetaria que participan en la adhesión y en el inicio de la agregación con sus ligandos correspondientes. ....	32
Tabla 2. Causas de trombocitopenia adquirida .....	52
Tabla 3. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (2008) de los síndromes mielodisplásicos. ....	55
Tabla 4. Test diagnósticos recomendados para el diagnóstico en pacientes con PTI ....	69
Tabla 5. Características de los pacientes con TPC secundaria a SMD .....	105
Tabla 6. Características de los pacientes con TPC postquimioterapia .....	106
Tabla 7. Características de los pacientes con PTI .....	107
Tabla 8. Niveles plasmáticos de factores involucrados en la coagulación .....	129
Tabla 9. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con AR TPO.....	130
Tabla 10. Características de los pacientes con PTI tratados con AR-TPO e IGIV.....	133



# RESUMEN



## ANTECEDENTES

La trombocitopenia es uno de los mayores determinantes del riesgo de sangrado. Sin embargo, la sintomatología hemorrágica no siempre se correlaciona con la cifra de plaquetas. Es conocido que algunos pacientes que presentan trombocitopenia grave, no tienen manifestaciones hemorrágicas tan frecuentes ni tan graves como cabría esperar. Así, es posible que la propia etiología de la trombocitopenia pudiera influir en el fenotipo hemorrágico de cada uno de ellos.

Esto podría explicarse porque las características funcionales de las plaquetas y la actividad procoagulante del plasma, podrían ser diferentes en función del mecanismo etiopatogénico de la trombocitopenia, de tal manera que el riesgo de sangrado propio de ésta, pudiera variar en mayor o menor medida.

Hasta ahora hay pocos estudios que evalúen los factores involucrados en estos hechos. Posiblemente, una de las mayores dificultades para ello, es que muchas de las técnicas utilizadas para el estudio de la funcionalidad plaquetaria se ven limitadas por el bajo recuento de plaquetas propio de estas situaciones. Sin embargo, técnicas como la citometría de flujo son capaces de evaluar la función de las plaquetas independientemente de su número. Asimismo, los test de generación de trombina son útiles para valorar tanto el fenotipo hemorrágico como el riesgo trombótico en estos pacientes.

## **OBJETIVO**

El objetivo primario de esta tesis fue estudiar si existían diferencias en la función plaquetaria y/o en la actividad procoagulante del plasma en pacientes con trombocitopenia distinto origen. Para ello se realizó un análisis comparativo entre pacientes con trombocitopenia de origen periférico (trombocitopenia inmune) y pacientes con trombocitopenia central (pacientes que han recibido tratamiento con quimioterapia y pacientes con síndrome mielodisplásico –SMD-) que nos permitiese averiguar el motivo por el cual, a igual grado de trombocitopenia, presentaban diferente gravedad y frecuencia de manifestaciones hemorrágicas.

Para ello se estudió en los diferentes grupos: la regulación del número de plaquetas por trombopoyetina; la producción de plaquetas inmaduras; la participación de la activación del sistema inmune en la destrucción de las plaquetas mediante la determinación de niveles plasmáticos de APRIL; las características funcionales de las plaquetas determinando su capacidad de activación y evaluándolas mediante la expresión de diferentes marcadores de activación; el grado de apoptosis en las plaquetas; la capacidad procoagulante asociada a micropartículas (MPs); el número y capacidad trombogénica de las MPs, así como la caracterización del origen celular de las mismas y el estudio de la capacidad procoagulante del plasma asociado a otros factores diferentes a las MPs.

El segundo objetivo del trabajo fue evaluar, en el grupo de pacientes con PTI, el efecto del tratamiento con AR-TPO sobre la funcionalidad plaquetaria, los niveles de APRIL y el estado procoagulante del plasma.



## MÉTODOS

Se incluyeron 83 pacientes con PTI y 35 pacientes con trombocitopenia central (18 con SMD y 17 en período de post-tratamiento con quimioterapia). Además, se incluyeron 87 controles sanos con distribuciones de edad y sexo similares a las de los grupos de pacientes.

Para evaluar la función plaquetaria, cuantificar las plaquetas reticuladas y detectar la presencia de cambios apoptóticos en la membrana plaquetaria, se utilizó la citometría de flujo. Para determinar la capacidad procoagulante del plasma se usó un test de generación de trombina, concretamente la trombinografía calibrada automatizada (*CAT, Calibrated Automated Thrombogram, Thrombinoscope*). La capacidad procoagulante asociada a MPs se determinó mediante un método cromogénico utilizando los kits de MP-Activity y MP-FT-Activity de ZYMUPHEN.

Tanto la determinación de los niveles plasmáticos de TPO como los de APRIL se realizaron mediante la técnica de ELISA.

## RESULTADOS

Todos los pacientes con trombocitopenia tenían una concentración circulante de TPO significativamente alta y este aumento era más pronunciado en aquellos pacientes con TPC. Sin embargo, el porcentaje de plaquetas reticuladas, que indica la existencia de una médula ósea funcional, sólo estaba aumentado en los pacientes con PTI y trombocitopenia.

Los niveles de APRIL, estimulante de la proliferación de linfocitos B y de la producción de anticuerpos, sólo se encontraban elevados en los pacientes con PTI, independientemente de que en ese momento presentaran o no trombocitopenia. Esto resalta el mecanismo autoinmune de la enfermedad, en la cual se produce una destrucción acelerada de plaquetas mediada por anticuerpos.

Nuestros resultados mostraron una disminución en la activación de las plaquetas inducida por agonistas y evaluada a través de la activación del receptor del Fg, tanto en pacientes con PTI como con TPC, lo cual no se debió a que tuviesen un número menor de receptores para el Fg en su superficie, ya que su expresión era comparable a la observada en las plaquetas de los controles sanos. Adicionalmente, los pacientes con TPC, pero no los de PTI, presentaron una disminución en la expresión de P-selectina, indicando una anomalía en el mecanismo de secreción de gránulos.

Asimismo, comprobamos que las plaquetas tanto de los pacientes con PTI como de los que presentaban TPC, expresaban más signos de apoptosis, medidos como expresión de PS, que los controles sanos. Sólo en los pacientes con TCP se observó una correlación inversa entre el número de plaquetas y la exposición de PS. Por el contrario, en ambos grupos de pacientes con trombocitopenia, cuanto mayor era la exposición de PS, menor era la capacidad de activación de las plaquetas, hecho éste que indica que la disfunción plaquetaria dependía, al menos en parte, de su grado de apoptosis.

Los pacientes con PTI y con TPC mostraron una mayor capacidad procoagulante asociada a MPs que los controles sanos. Los pacientes con PTI y trombocitopenia,

mostraron tener aumentadas las MPs procedentes de las plaquetas y de los glóbulos rojos, mientras que los de TPC tenían aumentadas las MPs originadas de monocitos.

Nuestros experimentos pusieron de manifiesto que el plasma de los pacientes con PTI, independientemente de si tenían o no en ese momento trombocitopenia, tenían mayor capacidad de generar trombina que los controles y los pacientes con TPC. Por otro lado, encontramos un incremento en los niveles de FVII y de FXII en los pacientes con PTI, que podría justificar el aumento de la generación de trombina.

En cuanto al efecto del tratamiento con AR-TPO observamos que, cuando los pacientes respondían a estos fármacos, el número absoluto de plaquetas aumentaba y descendía el número de plaquetas reticuladas que estaba previamente aumentado como mecanismo compensatorio. Estos fármacos no modificaron la disfunción plaquetaria ni el perfil hipercoagulante observado en los pacientes con PTI antes del tratamiento. Por el contrario, los AR-TPO disminuyeron los niveles plasmáticos de APRIL.

## CONCLUSIONES

1. El mecanismo etiopatogénico de la PTI es la suma de una destrucción periférica y de una disminución de la megacariopoyesis producida por niveles inadecuados de TPO. A pesar de esta disfunción en el mecanismo compensatorio de la TPO, tienen un alto número de plaquetas reticuladas o inmaduras. Esto indica que su defecto en la megacariopoyesis no es tan importante como en los pacientes con TPC en donde existe una grave disfunción medular puesta de manifiesto por el bajo número de plaquetas reticuladas circulantes a pesar de los niveles de TPO altos.

2. Las plaquetas de los pacientes con PTI y las de aquellos con TPC tienen una menor capacidad de ser activadas por agonistas, lo cual parece deberse a un aumento en su apoptosis. Sólo en los pacientes con TPC existe una correlación entre el grado de apoptosis y el número de plaquetas, lo que sugiere una profunda dishematopoyesis compatible con el origen central de estas trombocitopenias.
3. Los pacientes con PTI y con TPC presentan un aumento en la capacidad procoagulante asociada a las MPs, las cuales proceden principalmente de las plaquetas y de los glóbulos rojos en la PTI y de los monocitos en los pacientes con TPC. Adicionalmente, el plasma de los pacientes con PTI es capaz de generar más trombina frente al estímulo que el plasma de pacientes con TPC y el de los controles. Este hecho podría explicar por qué las manifestaciones hemorrágicas en estos pacientes son menores que en los pacientes con TPC a igual grado de trombocitopenia.
4. La respuesta al tratamiento con AR-TPO de los pacientes con PTI no implica una mejora de la funcionalidad plaquetaria y tampoco aumenta el riesgo de trombosis.
5. Los AR-TPO podrían poseer una actividad inmunomoduladora además de su efecto estimulante de la producción de plaquetas.

# **1. INTRODUCCIÓN**



### 1.1. Plaquetas. Generalidades

Las plaquetas fueron descritas por primera vez en 1841 por Addison como unos “gránulos diminutos”. Durante mucho tiempo formaron parte del denominado “polvo de la sangre”, del cual se desconocía su función. En 1882 Bizzozero les dio el nombre de “plaquetas” y las describió como “extremadamente pegajosas” cuando ocurría una lesión vascular. Pero no es hasta 1906 cuando James Horner Wright las describe como fragmentos del citoplasma de los megacariocitos (MKs) y establece a éstos últimos como los elementos básicos de la megacariopoyesis [1].

Actualmente, sabemos que son los elementos formes más pequeños de la sangre (diámetro de unos 3  $\mu\text{m}$ ), que en condiciones fisiológicas su número varía entre 150 y 300 x 10<sup>9</sup>/L y que su vida media en la circulación es de aproximadamente 10 días.

En cuanto a sus funciones, además de su bien establecido papel en la hemostasia, participan en procesos importantes como la trombosis, la inflamación, la remodelación tisular y en los mecanismos de la defensa innata [2] .

La participación de las plaquetas en la hemostasia está bien caracterizada. Así, la rotura del endotelio vascular y la exposición del subendotelio, ponen en marcha una serie de reacciones que inducen la adhesión de las plaquetas a la matriz subendotelial, la activación plaquetaria por agentes de naturaleza diversa (liberados en el lugar de la lesión) y, finalmente, la formación de agregados celulares. Se forma así un “tapón” plaquetario que reduce la pérdida de sangre y proporciona el soporte para el ensamblado y activación de los factores de coagulación, proceso éste denominado hemostasia secundaria.

Su participación en procesos inflamatorios e inmunes ha sido apoyada por el hallazgo de los receptores *toll-like* (TLR) en la membrana de los MKs y de las plaquetas, los cuales modulan la liberación de citoquinas proinflamatorias. En este sentido, trabajos recientes han implicado a las plaquetas en el inicio y reactivación de diversas vasculitis. En estos estados patológicos, aumenta su sensibilidad a los activadores plaquetarios incrementándose la liberación de sustancias proinflamatorias como el sCD40L [3].

#### **1.1.1. Producción de plaquetas. Megacariopoyesis.**

La megacariopoyesis comprende todo el proceso de formación y diferenciación, desde las células hematopoyéticas más indiferenciadas hasta la producción de las plaquetas. Este proceso tiene lugar en nichos especializados de la médula ósea, donde los MKs se colocan adyacentes a las células endoteliales de la pared vascular.

En los últimos años, se han producido importantes avances en el conocimiento de la megacariopoyesis. En primer lugar se identificó el MK como la célula origen de las plaquetas, años más tarde se describieron las células precursoras de esos MKs, y posteriormente Kelemen describió una sustancia humoral a la que denominó trombopoyetina (TPO) [4]. La TPO se sintetiza en el hígado y el riñón, se une a su receptor presente en los MKs y en las plaquetas y activa a los diferentes procesos de señalización necesarios para la megacariopoyesis y la trombopoyesis [5]. Está considerada como una citoquina clave no sólo en la megacariopoyesis, sino también en la hematopoyesis, ya que alteraciones en la misma pueden provocar trombocitosis, trombocitopenia y anemia aplásica [6].

La célula más indiferenciada de la megacariopoyesis es una célula pluripotencial común con el resto de las células mieloides, la UFC-GEMM (Unidad Formadora de



Colonias de Granulocitos, Eritrocitos, Monocitos y Megacariocitos). Ésta da lugar a una célula bipotencial más diferenciada, llamada MEP (Célula Progenitora Mieloide y Eritroide), bien caracterizada por diferentes marcadores de superficie como  $IL-7R\alpha^-$  / $Lin^-$ /c-kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/FcR $\gamma$ <sup>lo</sup>, que da origen tanto a la serie megacariocítica como a la eritroide. Ésta se diferencia hacia los precursores de la serie megacariocítica, que expresarán CD41, CD61 (integrina  $\alpha IIb\beta 3$ ), glicoproteína (GP) V y CD42 (GP Ib) [1].

A diferencia de lo que ocurre en el resto de las células hematopoyéticas, en las células precursoras de la megacariopoyesis, las divisiones nucleares no van seguidas de las correspondientes divisiones citoplasmáticas, lo que conduce a la formación de células poliploides de gran tamaño con numerosos núcleos.

Se han descrito diferentes estadios evolutivos: el promegacarioblasto, el megacarioblasto, el promegacariocito, el MK granular formador de plaquetas y el MK liberador de plaquetas. Es este último, es el que al desprender partes de su citoplasma delimitadas por membranas, origina las plaquetas que circulan en la sangre periférica.

Así, hoy sabemos que las plaquetas son fragmentos del citoplasma de los MKs, y por tanto anucleadas, con un tamaño de 3  $\mu$ m de diámetro.

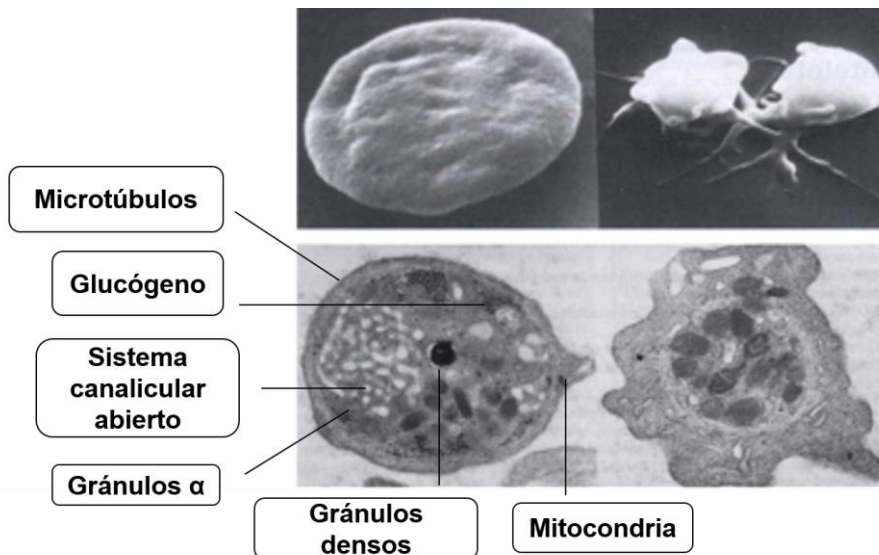
### **1.1.2. Anatomía de las plaquetas**

Las plaquetas en reposo tienen una forma discoidea. Cuando son activadas adoptan forma esferoidal con emisión de pseudópodos.

#### **1.1.2.1. Membrana plaquetaria**

En la membrana plaquetaria se pueden distinguir tres capas:

El glicocálix está constituido por las GPs de la membrana que actúan como receptores para los diferentes agonistas de la activación plaquetaria y para la interacción con otras células.



**Figura 1. Morfología plaquetaria en reposo y activada.** En la parte superior de la figura se muestran imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido. En la izquierda se muestra la forma discoidea de las plaquetas cuando están en reposo y en la derecha su forma esferoidal con pseudópodos cuando está activada. En la parte inferior se muestran las fotografías obtenidas con un microscopio electrónico de transmisión. La imagen de la izquierda muestra una plaqueta en reposo y la de la derecha, una plaqueta activada. (Adaptado de George JN. Platelets. Lancet 2000; 355 (9214):1531-9).

La unidad de membrana está constituida por una bicapa de fosfolípidos (PLs) entre los que se encuentran ancladas las GPs del glicocálix.

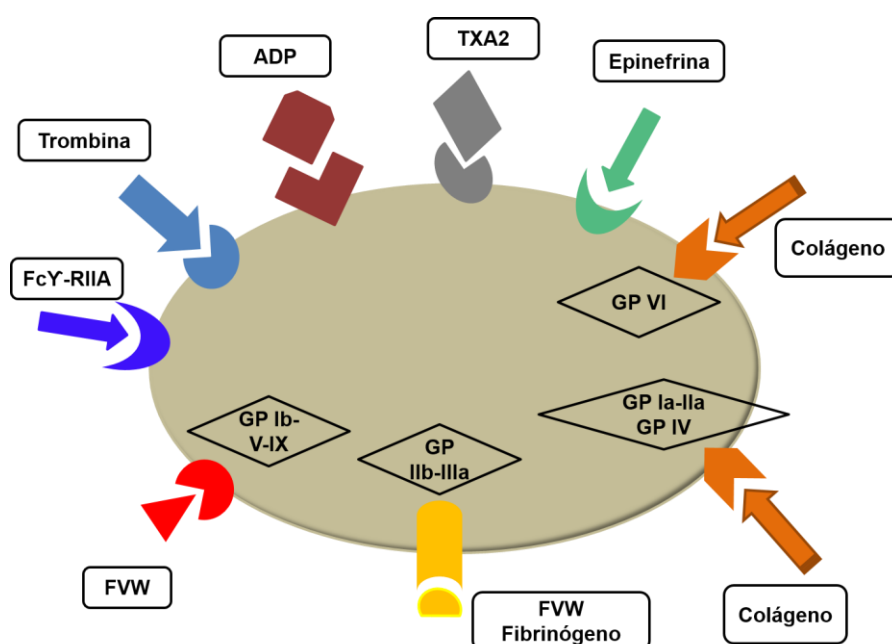
El área submembranosa está formada por estructuras fibrilares de las GPs unidas a las fibras de actina y miosina del citoesqueleto.

Podemos distinguir diferentes receptores en la superficie de las plaquetas:

**GPs**, en su mayoría pertenecientes a la superfamilia de las integrinas, que interaccionan con las proteínas adhesivas. Las que tienen una función más destacada son la GP Ib-V-IX (receptor del factor von Willebrand -FVW-), la GP IIb-IIIa (receptor del fibrinógeno y del FVW), la GPIa-IIa y la GPVI (receptores del colágeno), y la GPIV (receptor de la trombospondina y del colágeno).

**Receptores unidos a las proteínas G**, sobre los que actúan los agonistas solubles como la trombina, el Adenosín difosfato (ADP), el tromboxano A2 (TXA2) y la epinefrina (EPI).

**Receptores Fcγ-RIIA**, receptores específicos para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas.



**Figura 2. Receptores de la membrana plaquetaria.** Se muestran los diferentes receptores plaquetarios: GPs, receptores unidos a proteínas G y receptores de Fcγ-RIIA. Los receptores extracelulares activados inician la movilización de moléculas intracelulares efectoras que llevan a la movilización del calcio intracelular y a los procesos de fosforilación de la activación plaquetaria.

**Tabla 1. GPs de la membrana plaquetaria que participan en la adhesión y en el inicio de la agregación con sus ligandos correspondientes.**

Nomenclatura electroforesis	Nomenclatura actual	Ligando	Designación cluster
GPIa/IIa	Integrina $\alpha 2\beta 1$	Colágeno tipo I y IV	CD29, CD49b
GPIc/IIa	Integrina $\alpha 6\beta 4$	Laminina	CD29, CD49e
GPIc/IIa	Integrina $\alpha 5\beta 1$	Fibronectina	CD29, CD49f
GPIV	Receptor plaquetario mixto	Colágeno II y Trombospondina	CD36
GPVI	CAM del gen de la familia de las Ig	Colágeno	–
GPIIb/IX/V	CAM ricas en leucina	FVW y Trombina	CD42a, CD42b CD42c y CD42d
GPIIb/IIIa	$\alpha \text{IIb}-\beta 3$	FVW y Fibrinógeno	CD41 y CD61

*CAM: Molécula de adhesión celular. Ig: Inmunoglobulinas FVW: Factor von Willebrand*

#### **1.1.2.2. Citoesqueleto y citoplasma.**

El citoesqueleto es un conjunto de sistemas fibrilares, constituido fundamentalmente por actina y miosina, que proporciona a la plaqueta un mecanismo contráctil que le permite cambiar su forma y la configuración de sus receptores de superficie cuando es activada.

En el citoplasma se encuentran diversas organelas como los gránulos alfa y los gránulos densos, mitocondrias, lisosomas, así como depósitos de glucógeno.

Los gránulos  $\alpha$ , los más numerosos, contienen factor 4 plaquetario, fibrinógeno, fibronectina, factor (F) V, FVW, FXIII, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), trombospondina,  $\beta$ -trombomodulina, P-selectina y factores de crecimiento

como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el *insulin-like growth factor 1* y el *transforming growth factor  $\beta$* .

Los gránulos densos son menos numerosos y contienen ADP, ATP, histamina, serotonina, epinefrina y calcio.

#### **1.1.2.3. Sistemas membranosos**

Los más importantes son el sistema canalicular abierto y el sistema tubular denso.

**Sistema canalicular abierto.** Es un sistema de canales interconectados que recorren toda la plaqueta y facilitan tanto la captación como la liberación de diferentes sustancias.

**Sistema tubular denso.** Se encuentra en la membrana y forma parte del retículo endoplasmático liso. Se llama así por su opacidad en el microscopio electrónico. Éste es el principal reservorio tanto de calcio como de ácido araquidónico y es el lugar de síntesis del TXA<sub>2</sub>, debido a que es donde se encuentra la enzima ciclooxygenasa.

#### **1.1.2.4. Estructuras inespecíficas**

Dentro de este apartado se engloban elementos no específicos de las plaquetas que son comunes a otras células. Los más importantes son los lisosomas, cuyas funciones son la fagocitosis y la destrucción celular de partículas extrañas, las vesículas revestidas, que son formaciones de 70-90 nm que se originan en la membrana plaquetaria o en el sistema canalicular abierto y realizan fagocitosis mediada por receptores, las microperoxidasas, las mitocondrias, que son de menor tamaño que en otras células, y los ribosomas.

### **1.1.3. Plaquetas en la hemostasia: activación plaquetaria**

Las plaquetas contribuyen al mantenimiento de la circulación preservando la integridad vascular y controlando la hemorragia tras una lesión de la pared vascular. Esto lo hacen interviniendo tanto en la hemostasia primaria, a través de los procesos de adhesión y agregación, como en la hemostasia secundaria, sirviendo de anclaje a los distintos factores de la coagulación.

Los mecanismos fundamentales implicados en este proceso incluyen: la adhesión, la agregación, la secreción y la coagulación.

Una vez que se lesiona la pared vascular se liberan sustancias presentes en la matriz subendotelial como el colágeno, el ADP o la trombina, que se unen a sus respectivos receptores en la membrana de la plaqueta e inician su activación. En este momento las plaquetas cambian su morfología y estructura, comenzando así los procesos de adhesión y de agregación.

La adhesión se inicia al interaccionar las GPs de la membrana plaquetaria con la matriz subendotelial, fundamentalmente por la unión de la GPIb-V-IX al FvW fijado al colágeno del subendotelio. Otras GPs implicadas en la adhesión son la GPIa-IIa y la GPVI, que se unen también al colágeno subendotelial; la GPIc-IIa, receptor de la fibronectina que se une además de a la fibronectina y a la laminina; y la  $GP\alpha_5\beta_3$ , receptor de la vitronectina que se une a su ligando.

La activación plaquetaria debida a la unión de agonistas también promueve la “secreción” del contenido de los gránulos de las plaquetas. La secreción se desarrolla mediante la fusión de la membrana granular y la membrana plasmática, permitiendo

así la liberación del contenido de los gránulos. De esta manera, cuando las plaquetas se activan por el colágeno o la trombina, se produce ácido araquidónico que es rápidamente convertido en tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), el cual es el principal estimulador de la secreción plaquetaria. El TXA<sub>2</sub> facilita el paso del calcio del sistema tubular denso al citoplasma plaquetario. El calcio estimulará el sistema contráctil de la plaqueta (fibras de actina-miosina) las cuales cambian entonces su morfología, pasando a ser esféricas y emitir pseudópodos. También cambia la localización de los gránulos plaquetarios, que se colocarán en una posición central comunicados con el sistema canalicular abierto lo cual facilitará la expulsión de su contenido al exterior en el llamado proceso de secreción.

La secreción y la agregación plaquetaria son procesos íntimamente relacionados durante la hemostasia: la activación plaquetaria provoca la secreción del ADP, el cual estimula la agregación. La serotonina, liberada de los gránulos densos, además de actuar como vasoconstrictor, es un agente agregante.

En el proceso de agregación, la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (GPIIb/IIIa) juega un papel fundamental ya que es el receptor para el fibrinógeno. El fibrinógeno que participa en la agregación proviene del plasma o es secretado por los gránulos  $\alpha$  plaquetarios. La activación plaquetaria por los agonistas (ADP, colágeno, trombina) provoca un cambio en la conformación del receptor  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  que le permite adoptar un estado de alta afinidad por el fibrinógeno soluble y otras proteínas como la fibronectina, la vitronectina y el FVW presentes también en el plasma.

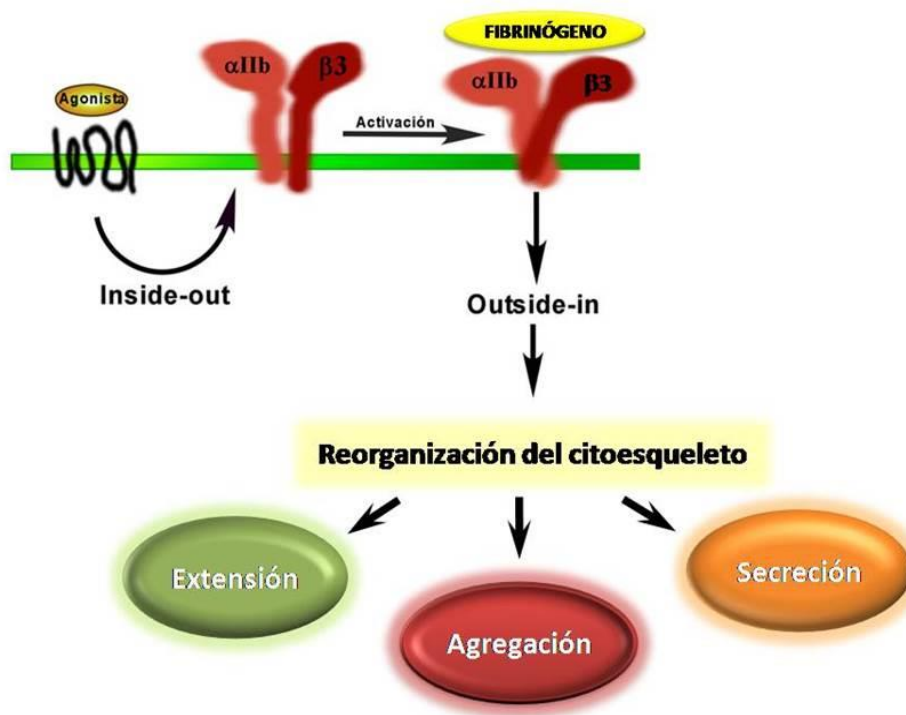
Así, el fibrinógeno es el principal mediador de la agregación plaquetaria por ser el ligando que se une con mayor afinidad a la integrina plaquetaria  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  y por ser una de las proteínas más abundantes del plasma. Además, el fibrinógeno, al ser una proteína dimérica, permite la formación de los puentes interplaquetarios responsables de la agregación.

El mecanismo de activación del receptor de fibrinógeno (integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ) ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años [7, 8].

Una vez que la plaqueta es activada por los diferentes agonistas genera una señalización intracelular que involucra elementos de las rutas clásicas de transducción de señales tales como las proteínas G y las tirosina quinasas que promueven la activación de la fosfolipasa C, cambios del calcio citosólico y la activación de otras proteínas quinasas intracelulares como la proteína quinasa C. Como resultado se producen señales de origen intracelular que se denominan “*inside-out*” que provocan un cambio en la estructura del receptor del fibrinógeno y un aumento de la afinidad por su ligando.

La unión del fibrinógeno a su receptor inicia un proceso de señalización “*outside-in*” que genera una cascada de sucesos tales como el agrupamiento de las integrinas y la formación de estructuras conocidas como contactos focales. Estos ensamblajes proteicos tienen un importante papel en la modulación de la adhesión celular, la secreción y en la inducción de los cambios morfológicos implicados en la extensión y locomoción celular.



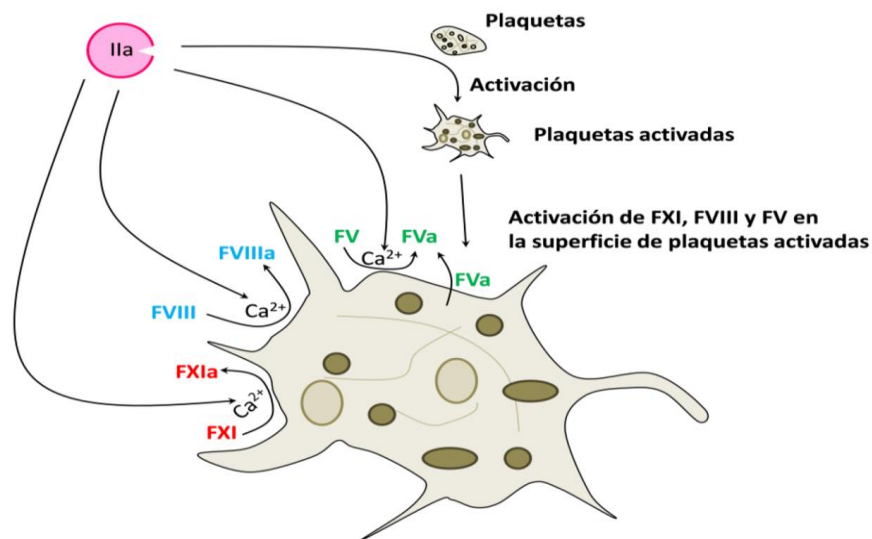


**Figura 3. Receptor del fibrinógeno.** Efecto de agonistas (señal inside-out) sobre la activación del receptor de fibrinógeno plaquetario y generación de señales hacia el interior de la célula (señal outside-in). Como consecuencia se activan numerosos procesos plaquetarios como la agregación, la secreción de sustancias proactivas y la extensión del cuerpo celular para la emisión de pseudópodos, la locomoción y la adhesión plaquetaria.

El fibrinógeno del plasma y el FVW liberado por el endotelio lesionado y las plaquetas activadas, facilitan la formación de un tapón hemostático primario. Sin embargo, el tapón hemostático es inestable (3-5 minutos) y debe ser fortalecido para que detenga eficazmente la hemorragia. El fortalecimiento del coágulo se logra a través de la hemostasia secundaria mediante la formación de una malla insoluble de fibrina.

Por lo tanto, las plaquetas intervienen también en la hemostasia secundaria. Una vez activadas, su superficie sirve de anclaje a los distintos factores de coagulación al exponer PLs cargados negativamente. El incremento de calcio en el citoplasma causa, a través de la flipasa, una asimetría de los PLs de membrana, exponiendo

fundamentalmente fosfatidilserina (PS). Estos PLs aniónicos permiten el ensamblado de los distintos factores de la coagulación que favorecen la generación de trombina, siendo esta última un importante inductor de la activación plaquetaria [9].



**Figura 4. Interacciones de las plaquetas en el proceso de coagulación.** Las plaquetas y otros elementos celulares tienen un papel primordial en el modelo celular de la coagulación. En la figura podemos observar cómo las pequeñas cantidades de trombina generadas en la fase de inicio, son capaces de activar, por un lado, las plaquetas circulantes, que en ese momento exponen PLs aniónicos, y por otro, factores de coagulación como el FV, el FVIII y el FXI. También podemos observar cómo en una fase posterior, la fase de amplificación, los PLs plaquetarios servirán de anclaje a distintos factores de la coagulación para dar lugar a una importante generación de trombina.

#### 1.1.4. Apoptosis de las plaquetas

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo fisiológico que regula la vida celular, en respuesta a diferentes estímulos, teniendo como objetivo eliminar las células “dañadas” o no deseadas.

En un principio se pensó que este proceso sólo ocurría en células con núcleo pero trabajos recientes demuestran que también se produce en células anucleadas como las plaquetas. Se han descrito diferentes receptores de la superficie plaquetaria implicados en la apoptosis así como diferentes vías de señalización [9].

Dos vías, una intrínseca y otra extrínseca, regulan la apoptosis en mamíferos [10]. Ambas convergen en la activación de las caspasas, principales efectoras de la apoptosis [11].

La vía extrínseca involucra a diferentes receptores transmembrana, fundamentalmente pertenecientes a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Los modelos FasL/FasR y TNF $\alpha$ /TNFR1 son los que mejor caracterizan los eventos de la vía extrínseca. Esta unión de ligandos y receptores inicia la apoptosis al producir la activación de las caspasas. Estas últimas, activarán tanto a las endonucleasas citoplasmáticas que degradan el material celular, como a las proteasas que digieren las proteínas nucleares y el citoesqueleto.

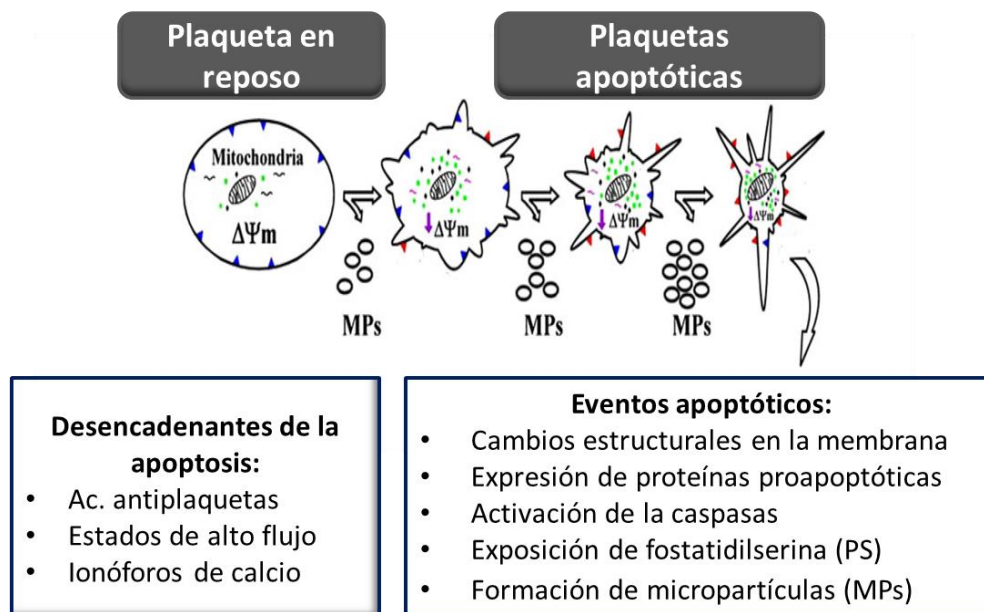
La vía intrínseca depende de las mitocondrias ya que requiere la disrupción de la membrana mitocondrial. En esta vía tiene una especial importancia la familia de proteínas BCL-2 que regula los procesos de permeabilización mitocondrial. Dentro de la familia de proteínas BCL-2 se han descrito tres subfamilias, dos proapoptóticas (subfamilias BAX y BH3) y una anti-apoptótica (subfamilia BCL-2, que en las células sanas, protege de la activación del BAX) [12, 13].

La apoptosis se inicia por daño en el DNA o estrés celular que activa la expresión del gen supresor de tumores p53, responsable de la activación de proteínas

proapoptóticas, como son PUMA, NOXA y BID pertenecientes a la subfamilia BH3, las cuáles activan a la subfamilia BAX. La expresión de estas proteínas aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa liberando sustancias como el citocromo C que activarán el sistema de las caspasas, las cuáles iniciarán los cambios apoptóticos [14].

En el caso de las plaquetas, un almacenamiento prolongado de las mismas, los anticuerpos anti plaquetas, las fuerzas reológicas en estados de flujo alto y diferentes estímulos celulares externos como los ionóforos de calcio pueden inducir apoptosis. Estas conducen a cambios estructurales en la membrana: pérdida de ácido siálico y alteraciones en la distribución de PLs, despolarización, expresión de proteínas proapoptóticas (proteínas de la familia BCL-2), activación de la caspasa-3 y la caspasa-9, exposición de fosfatidilserina (PS) y formación de micropartículas (MPs) derivadas de las plaquetas [11].

Pero la expresión de PS en la superficie plaquetaria no es sólo indicador de apoptosis, ya que también se ha observado en plaquetas activadas, donde la PS facilita la formación del complejo tenasa y, por último, la generación de trombina [15].



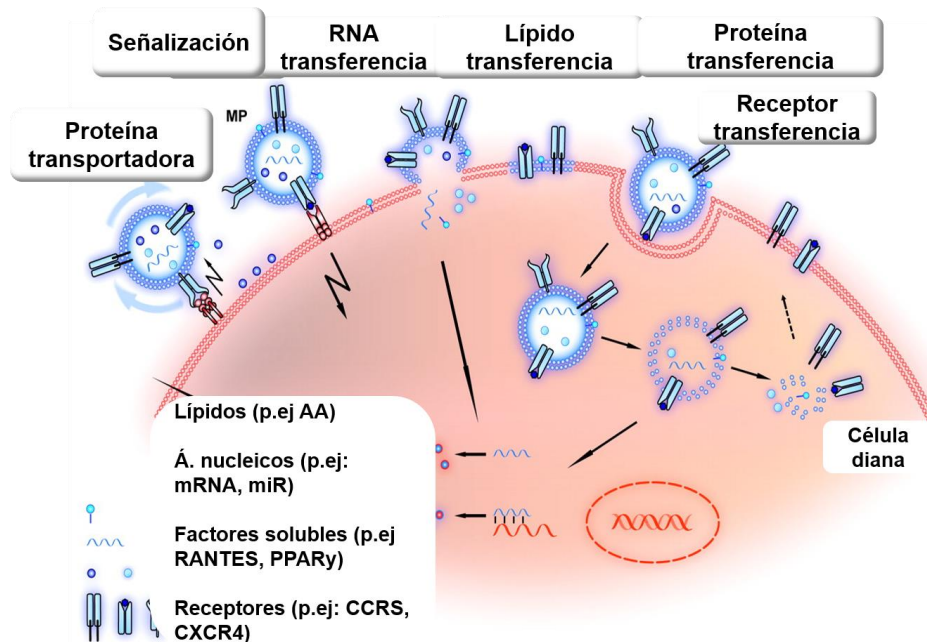
**Figura 5. Cambios implicados en la apoptosis.** En la figura se muestran cómo diferentes estímulos pueden desencadenar la apoptosis en las plaquetas induciendo cambios estructurales entre los que se encuentra la despolarización de la membrana mitocondrial. (Adaptado de Gyulkhandanyan A. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J Thromb Thrombolysis* 2012; 33:397–411)

#### 1.1.5. Micropartículas.

Las MPs son vesículas de aproximadamente 0,1 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro formadas por PLs y proteínas. Derivan de diferentes tipos celulares: hematíes, neutrófilos, plaquetas, monocitos, linfocitos y células endoteliales, siendo las más frecuentes las derivadas de las plaquetas (entre un 70-90%).

No poseen núcleo ni capacidad de síntesis proteica pero sí tienen citoesqueleto. En su membrana se encuentran PLs aniónicos y proteínas constitutivas, y en su interior proteínas correspondientes a su estirpe celular y microRNAs. Además expresan en su superficie antígenos específicos de las células de las que proceden. En ocasiones MPs de distintos orígenes pueden fusionarse y producir MPs de características mixtas.

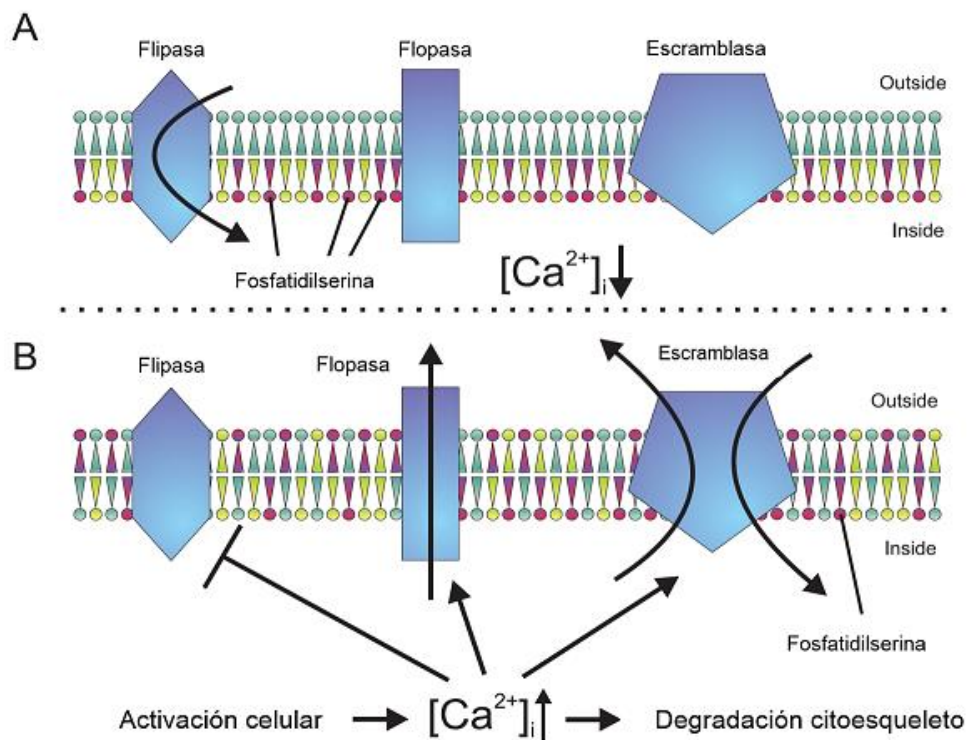
Todas estas circunstancias hacen que las MPs sean importantes mediadores de señalización intercelular (Figura 6).



**Figura 6. Micropartículas como mediadores de señalización.** La figura muestra las diferentes fases en la formación de MPs y su acción en la célula diana. (Adaptado de Mause SF et al. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intracellular information exchange. *Circ Res* 2010; 107 (9):1047-57)

La sobreexpresión de MPs se observa tanto en estados fisiológicos como patológicos, tales como la respuesta inmune, la hemostasia, la trombosis, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las infecciones y el embarazo. Se les ha otorgado un papel importante en la trombosis pero también en otras patologías como la infección por priones, por Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y septicemias [15].

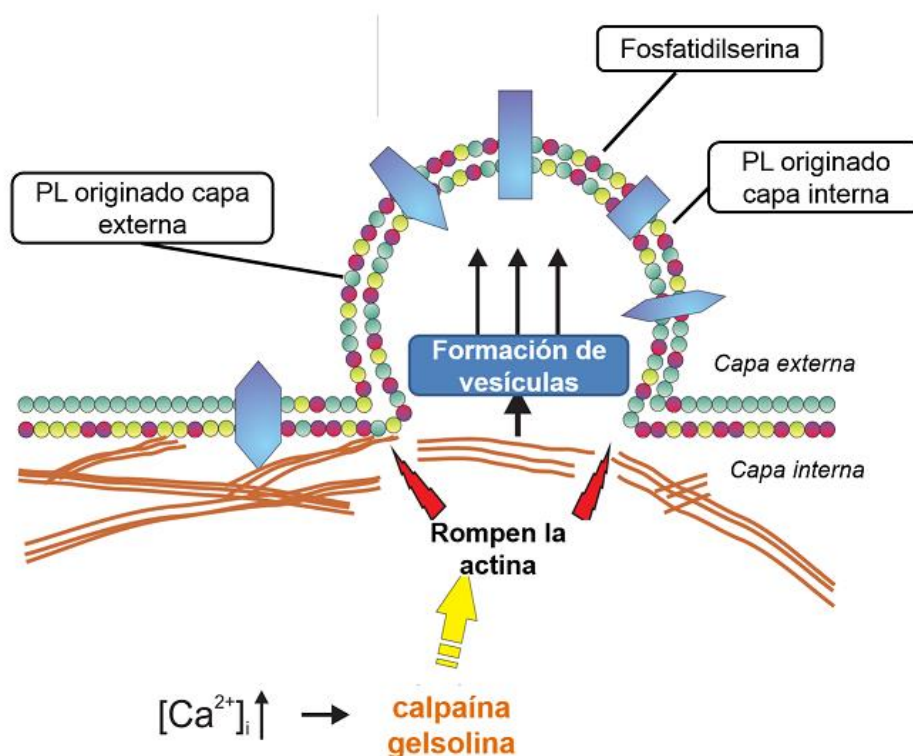
La formación de MPs sucede durante la activación celular o en otros procesos celulares como la apoptosis. En condiciones normales, la membrana celular es asimétrica en cuanto a la composición y distribución de los PLs de sus capas interna y externa. En la capa más externa se sitúan la fosfatidilcolina y la esfingomielina, mientras que la PS y la fosfatidiletanolamina (PE) están presentes en la capa interna. Esta distribución asimétrica se mantiene gracias a tres sistemas enzimáticos: el de la flipasa, la flopasa y la escramblasa. En condiciones de reposo sólo se encuentra activa la flipasa, pero cuando se produce la activación de la célula o durante los procesos de apoptosis, se libera calcio del retículo endoplásmico, inactivándose la flipasa y activándose la flopasa y la escramblasa, con lo que se pierde la asimetría de la membrana (Figura 7). Además el calcio liberado activa dos enzimas, la calpaína y la gelsolina (esta última presente únicamente en las plaquetas) que hidrolizan los puentes de actina, debilitando su unión con las GPs de membrana y formándose los ectosomas que darán lugar a las MPs. Así, el principal mecanismo de formación de PMPs (micropartículas derivadas de plaquetas) es calpaín-dependiente [15].



**Figura 7. Sistemas implicados en el mantenimiento de la membrana plaquetaria.** La figura muestra la asimetría en la membrana celular, en cuanto a la composición y distribución de los PLs. En la capa más externa se encuentran la fosfatidilcolina y esfingomielina, y en la interna están la fosfatidilserina y fosfatidiletanolamida. Esta distribución asimétrica de los PLs de membrana se mantiene por tres sistemas enzimáticos que son: el de la flipase, flopase y escramblasa. (Adaptada de Burnier L et al. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost* 2009;101: 439–451)

Aproximadamente el 25% de la actividad procoagulante de la sangre se debe a las MPs derivadas de las plaquetas. La capacidad de las MPs para iniciar la coagulación se debe a que expresan en su superficie FT y, posteriormente, a la fusión de las MPs con las plaquetas activadas, proceso que requiere de la interacción del Ligando Glicoproteico 1 de la P-selectina (PSGL-1) de las MPs con la P-selectina plaquetaria. Además la MPs, a través de sus PL aniónicos de membrana sirven de anclaje a diferentes factores de la coagulación [16, 17].





**Figura 8. Mecanismo de formación de MPs.** En la figura se muestra la formación de MPs, comenzando con la pérdida de la asimetría de la membrana de la plaqueta, la posterior liberación de calcio que activa la calpaína y la gelsolina, las cuales hidrolizan los puentes de actina, y dan lugar a los ectosomas y posteriormente a las MPs. (Adaptada de Burnier L et al. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost* 2009;101: 439–451)

## 1.2. Coagulación. Generación de trombina.

Clásicamente se distinguían cuatro fases en la hemostasia fisiológica: 1) vasoconstricción de la zona lesionada, 2) formación del agregado plaquetario, 3) generación de trombina y de fibrina como producto final, con su posterior estabilización, y 4) eliminación de la fibrina por la fibrinólisis. Aunque hoy sabemos que todas estas etapas están interconectadas, se sigue hablando de hemostasia primaria y de hemostasia secundaria.

### **1.2.1. Hemostasia primaria**

Cuando se produce la lesión del endotelio, se expone el colágeno subendotelial iniciándose los procesos de la hemostasia primaria, con la interacción entre la plaqueta y la superficie celular dañada.

Así, comienza la adhesión entre las GPs de la membrana plaqueta y diferentes componentes subendoteliales como el FVW, el colágeno, la tromboespondina, la fibronectina o la laminina. Al inicio, una de las GPs más importantes es la GPIb/V/IX que se une al FVW sintetizado por el endotelio o al circulante en el plasma. La GPIb/V/IX y el FVW se unirán a las fibras de colágeno tipo I y III que quedan expuestas en el subendotelio. Esta unión, a su vez, facilita la interacción entre la GPVI y el colágeno de la matriz subendotelial sobre todo en aquellos vasos sanguíneos donde la velocidad de flujo es alta. La interacción GPVI-colágeno activa a la plaqueta y la secreción de mediadores como el ADP, la adrenalina, la serotonina y el  $\text{TXA}_2$ , los cuales contribuyen a la vasoconstricción y a la activación y el reclutamiento de nuevas plaquetas hacia el lugar de la lesión. Además, en este momento se produce un estado de mayor afinidad de las integrinas plaquetarias  $\alpha 2\beta 1$  (receptor de colágeno),  $\alpha 5\beta 1$  (receptor de fibronectina),  $\alpha 6\beta 1$  (receptor de laminina) y  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  (receptor de fibrinógeno, que también une FVW y fibronectina) que permiten la adhesión firme de la plaqueta a la matriz subendotelial, así como la agregación plaquetaria.

### **1.2.2. Hemostasia secundaria**

La hemostasia secundaria consiste en una cascada de reacciones proteolíticas que conducen a la formación de una proteína insoluble que es la fibrina.

Son esenciales en este proceso los factores de la coagulación, proteínas que se encuentran en la sangre como zimógenos inactivos y que pueden ser activados en enzimas con actividad serín-proteasa mediante proteólisis.

Actualmente se consideran las células como elementos esenciales en la formación del coágulo y la trombina como la proteína fundamental de su estructura. En este proceso se distinguen tres fases: inicio, amplificación y propagación [18].

### **Fase de inicio**

Se produce por la interacción del factor tisular (FT) y el FVIIa, considerándose esta unión uno de los elementos fundamentales en el comienzo de la coagulación. Las células activadas (fundamentalmente los monocitos y las células endoteliales) expresan el FT, el cual se combina con el FVIIa y este complejo FT/FVIIa activa los factores IX y X. El FX activado (FXa) activa pequeñas cantidades del FV, que junto al FVa liberado de los gránulos plaquetarios, permitirá la formación del complejo protrombinasa (FXa-FVa). Éste actuará sobre la protrombina dando lugar a pequeñas cantidades de trombina.

Existen varios mecanismos para limitar la coagulación al sitio de la lesión. Así, las moléculas de FXa que abandonan la superficie celular en la que se han formado, son inactivadas rápidamente por el inhibidor de la vía del FT (TFPI, del inglés "*Tissue Factor Pathway Inhibitor*") o por la antitrombina-III (AT-III).

### **Fase de amplificación**

En esta fase la superficie celular implicada es la membrana plaquetaria. Esas pequeñas cantidades de trombina generadas en la fase de inicio son capaces de activar los cofactores de coagulación V y VIII, el FXI así como las plaquetas, las cuales cambian su configuración y estructura. Este cambio produce la exposición de PLs cargados negativamente como la PS en su membrana los que servirán de anclaje a los diferentes factores de la coagulación.

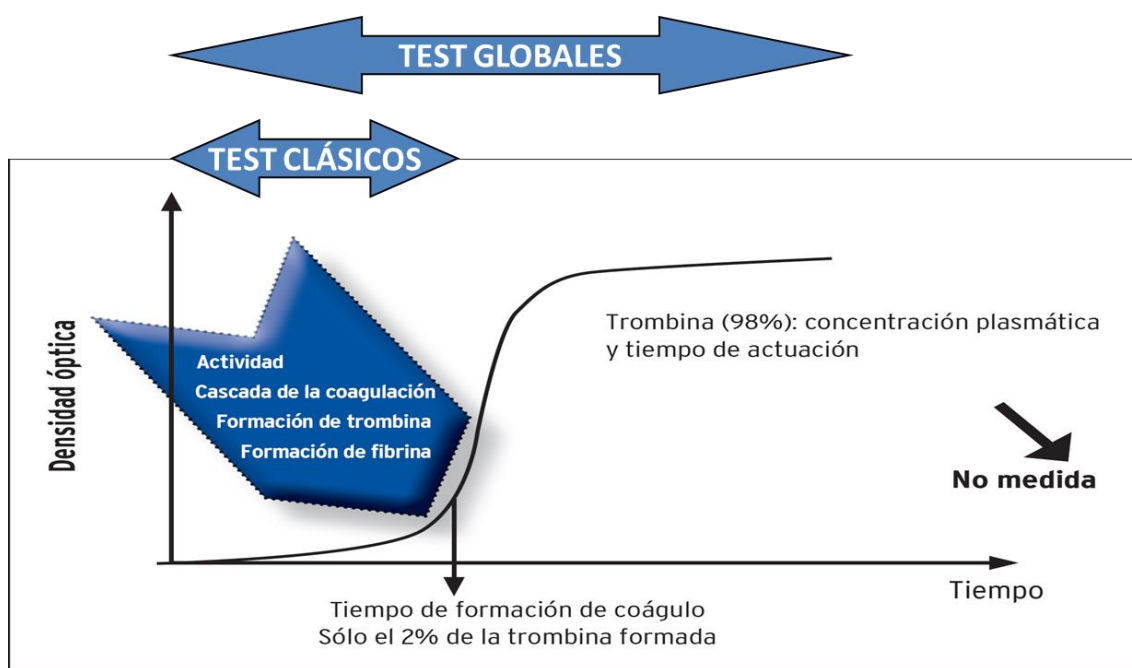
### **Fase de propagación**

Tiene lugar también en la superficie de las plaquetas, donde se generan grandes cantidades de FXa que convierten la protrombina en trombina y el fibrinógeno en fibrina. Es en esta fase donde se producen grandes cantidades de trombina y de fibrina.

#### **1.2.3. Test de Generación de Trombina (TGT)**

En los últimos años cada vez son más utilizados los test globales de la coagulación como la trombinografía, la tromboelastografía y el *“wave form analysis”*. A diferencia de los test clásicos como el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de cefalina (TTPa) que ofrecen una imagen fija y estática de la coagulación, estos test exploran la formación del coágulo en su totalidad. El TP y el TTPa sólo miden el tiempo en el que se alcanza la cantidad suficiente de trombina (aproximadamente 10 nM o el 1-2% de su potencia real) para iniciar el coágulo, pero no el resto de las características del mismo. Sin embargo, con los test de generación de trombina y con la

tromboelastografía podemos explorar todas las interacciones entre las distintas proteasas y sus inhibidores [19].



**Figura 9. Comparación de la generación de trombina medida entre los test clásicos de la hemostasia y los test globales.** Como muestra la figura los test clásicos utilizados para evaluar la coagulación miden sólo un 2% de la trombina formada, sin embargo con los test globales de la hemostasia son capaces de evaluar toda la trombina formada. (Modificada de Kitchen S et al. *Haemophilia* 2010; 16 Suppl 5: p. 61-6)

La trombina es el elemento fundamental de la coagulación que interviene en la hemostasia primaria (principal activador de las plaquetas), en la fase de amplificación de la hemostasia secundaria (activando diferentes cofactores como el FVIII y el FV), así como en el crecimiento del trombo. Por este motivo determinar la capacidad de generar trombina en los diferentes sujetos es fundamental para evaluar su tendencia trombótica o hemorrágica. Así, a principios de los 80 varios laboratorios comenzaron a realizar los TGT utilizando métodos muy complejos. Y es a finales de esa década

cuando Hemker simplifica el método y traslada los hallazgos de las investigaciones bioquímicas a la práctica clínica. Desarrolló un método fluorimétrico que cuantifica la trombina generada en una muestra de plasma después de la activación de la coagulación. Este método se conoce con las siglas “CAT” del inglés de “*Calibrated Automated Thrombogram*”, que se podría traducir por “Trombinografía Automatizada Calibrada”.

Consiste en añadir a la muestra estudio, en la que queremos conocer la cantidad de trombina que se ha formado, un sustrato fluorogénico específico de la trombina que al ser escindido por ella libera fluorescencia. El desarrollo de la fluorescencia en función del tiempo permitirá conocer la cinética de la generación de trombina. Calibrando cada muestra individualmente podemos obtener una curva de generación de trombina o trombinograma, con un procedimiento sencillo, que nos aporta mucha información con un aceptable margen de error (<5%) [20].

Los parámetros que se obtienen en el test son: a) el tiempo de latencia (TL), es el tiempo requerido para la formación de 10 nM de trombina; b) el tiempo al pico (TAP), tiempo requerido para alcanzar la máxima concentración de trombina; c) la altura del pico (AP), máxima cantidad de trombina alcanzada; y d) el potencial endógeno de trombina (ETP), que representa la capacidad máxima de generación de trombina de la muestra y es equivalente al área bajo la curva de la concentración de trombina vs el tiempo.

Cada vez hay más evidencia de que los parámetros del trombinograma y fundamentalmente el área bajo la curva (potencial endógeno de trombina, ETP) son extremadamente útiles para evaluar el riesgo hemorrágico o trombótico [21].

### **1.3. Trombocitopenia.**

Es la disminución del recuento de plaquetas por debajo del límite inferior normal ( $150 \times 10^9/L$ ). Clínicamente, suele considerarse relevante cuando es inferior a  $100 \times 10^9/L$ . En condiciones fisiológicas, el mantenimiento del número de plaquetas se debe a un correcto balance entre su producción y su destrucción.

Las trombocitopenias pueden ser hereditarias o adquiridas.

Las hereditarias son un grupo heterogéneo difícil de clasificar, en los que diferentes mutaciones genéticas condicionan una disminución de los megacariocitos, o una trombopoyesis ineficaz, o alteraciones estructurales de las plaquetas. En este grupo se encuentran entidades como la Trombocitopenia Amegacariocítica, Congénita, Trombocitopenia Amegacariocítica con sinostosis radioulnar, Trombocitopenia con ausencia de radio, Síndrome de Wiskot Aldrich, Síndrome de May-Hegglin; Fechner, Sebastian y Epstein así como el Síndrome de DiGeorge.

En cuanto a la trombocitopenias adquiridas, mucho más frecuentes que las anteriores, se pueden clasificar de origen central, periférico o una combinación de ambas. En este trabajo nos centraremos en las trombocitopenias adquiridas, considerando dentro de las centrales las producidas tras la administración de quimioterapia y las debidas a SMD y, dentro de las periféricas, la trombocitopenia inmune.

**Tabla 2. Causas de trombocitopenia adquirida.**

Central		
Por afectación global de la hematopoyesis	Supresión o hipoplasia	<ul style="list-style-type: none"><li>• Anemia aplásica</li><li>• Hemopatías malignas</li><li>• Otras (postquimioterapia y postradioterapia)</li></ul>
	Hematopoyesis ineficaz	<ul style="list-style-type: none"><li>• Síndromes mielodisplásicos</li><li>• Hemoglobinuria paroxística nocturna</li><li>• Déficit de factores de maduración</li></ul>
Por afectación megacariocítica aislada o predominante	<ul style="list-style-type: none"><li>• Púrpura trombocitopénica amegacariocítica adquirida</li><li>• Trombocitopenia cíclica amegacariocítica</li><li>• Trombocitopenia refractaria</li><li>• Otras (infección, enolismo)</li></ul>	
Periférica		
Inmunes	Autoinmunes	<ul style="list-style-type: none"><li>• Trombocitopenia inmune primaria</li><li>• Trombocitopenia inmune asociada<sup>1</sup></li><li>• Trombocitopenia inducida por fármacos<sup>2</sup></li></ul>
	Aloinmunes	<ul style="list-style-type: none"><li>• Trombocitopenia neonatal aloinmune</li><li>• Trombocitopenia postransfusional</li><li>• Refractariedad a las transfusiones de plaquetas</li></ul>
	Otras	<ul style="list-style-type: none"><li>• Pseudotrombocitopenias inmunes</li><li>• Trombocitopenia cíclica periférica</li><li>• Síndrome antifosfolípido</li><li>• Enfermedad injerto contra huésped (EICH)</li><li>• Enfermedad venooclusiva hepática (EVOH)</li></ul>
No inmunes	Por hiperconsumo	<ul style="list-style-type: none"><li>• Coagulación intravascular diseminada</li><li>• Microangiopatía trombótica (PTT, SHU)</li></ul>
	Por destrucción	<ul style="list-style-type: none"><li>• Circuitos extracorpóreos</li><li>• Infecciones</li></ul>
	Por pérdida al exterior	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hemorragias</li><li>• Hemodiálisis</li></ul>
	Por distribución anómala	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hiperesplenismo</li><li>• Hipotermia</li></ul>

<sup>1</sup>VIH, VHC, otras infecciones víricas, enfermedades autoinmunes, síndromes linfoproliferativos crónicos.

<sup>2</sup>Heparina, sulfonamidas, quinina, quinidina, tiazidas, fenitoína, sales de oro, antagonistas de la GPIIb/IIIa

Tabla adaptada de Manual Práctico de Hematología Clínica 2012. 4ª Ed.



### **1.3.1. Trombocitopenia de origen central.**

Se produce por afectación de alguna de las células precursoras. Cuando la afectada es la “*stem cell*” pluripotente se asocia a otras citopenias. Esto es lo que ocurre en los pacientes con SMD y en los pacientes tratados con quimio y radioterapia mieloablativa/mielosupresiva.

#### **1.3.1.1. Trombocitopenia postquimioterapia**

Los quimioterápicos no actúan exclusivamente sobre la célula tumoral, ya que al actuar sobre los distintos mecanismos de la división celular, afectan también a las células sanas, especialmente a las que tiene una gran capacidad de replicación o renovación, como las células hematopoyéticas. Estas últimas son las más expuestas a esta destrucción, efecto que se conoce como mielosupresión. La mayoría de quimioterápicos empleados actúan sobre la maduración y proliferación celular. El tiempo y la duración de la mielosupresión depende no sólo del esquema quimioterápico (fármacos, dosis, duración, vía de administración) sino que también del paciente (edad, estado nutricional, funcionamiento de la médula, tratamientos previos). Aparece entre la primera y la tercera semana tras el tratamiento, y en función de su gravedad, puede afectar de manera importante la calidad de vida de los pacientes, precisando en ocasiones retrasar los tratamientos o incluso modificarlos.

Los grados de toxicidad hematológica definidos por el NCI (*National Cancer Institute*) son:

- Grado 1: cifra de plaquetas normal ó  $>75 \times 10^9/L$ .
- Grado 2: cifra de plaquetas entre  $50-75 \times 10^9/L$ .

- Grado 3: cifra de plaquetas entre  $25-50 \times 10^9/L$ .
- Grado 4: cifra de plaquetas  $< 25 \times 10^9/L$ .

#### **1.3.1.2. Trombocitopenia por Síndrome mielodisplásico**

Los SMD son un grupo heterogéneo de enfermedades clonales de las células hematopoyéticas pluripotentes caracterizados por la presencia de alteraciones morfológicas de las células de las diferentes líneas hematopoyéticas, citopenias, con médula ósea normo o hiper celular y frecuente evolución a leucemia aguda mieloide (LAM).

La mediana de edad de aparición es de 70 años y su incidencia es de 3-5 casos/100.000 habitantes/año (20-30 en >70 años). Esta incidencia ha aumentado en los últimos años debido a un mejor diagnóstico, al envejecimiento de la población y a un aumento de los SMD secundarios. Según su etiología se pueden clasificar en dos grupos: los SMD primarios, que surgen sin ningún desencadenante conocido y los SMD secundarios, que surgen tras el tratamiento con quimioterapia, radioterapia o exposición a derivados benzólicos.

La clasificación más utilizada es la de la Organización Mundial de la Salud del 2008 [22]. El curso clínico y la supervivencia son muy variables. Las infecciones y/o las hemorragias secundarias al fallo medular son la principal causa de muerte. Varios índices pronósticos intentan predecir la supervivencia y evolución de la enfermedad, uno de los más utilizados es el Índice Pronóstico Internacional, IPSS (del inglés *International Prognostic Scoring System*), en el que se evalúa el número de blastos en médula ósea, el cariotipo y el número de citopenias [23].

**Tabla 3. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (2008) de los Síndromes mielodisplásicos.**

	Citopenias	Monocitos en sangre periférica	% blastos en sangre periférica	% blastos médula ósea	Sideroblastos en anillo	Displasia (>10% de línea)
<b>CRDU</b>	1 ó 2 citopenias	$<1 \times 10^9/L$	$< 1\%$	$< 5\%$ no bastones de Auer	$<15\%$	Unilineal
<b>CRDM*</b>	1 a 3 citopenias	$<1 \times 10^9/L$	$< 1\%$	$< 5\%$ no bastones de Auer	$<15\%$ o $>15\%$	$\geq 2$ líneas
<b>ARS</b>	Anemia	$<1 \times 10^9/L$	0%	$< 5\%$ no bastones de Auer	$>15\%$	Solo eritroide
<b>AREB-1</b>	Citopenia(s)	$<1 \times 10^9/L$	$\geq 1\%$ y $< 5\%$ sin bastones de Auer	5-9% sin bastones de Auer	Indiferente	Indiferente (unilínea o multilínea)
<b>AREB-2</b>	Citopenia(s)	$<1 \times 10^9/L$	5-19 % o bastones de Auer	10-19% o bastones de Auer	Indiferente	Indiferente (unilínea o multilínea)
<b>SMD con del(5q)</b>	Anemia		$< 1\%$	$< 5\%$ sin bastones de Auer	Indiferente	Indiferente
<b>SMD inclasificable</b>	Citopenias		$\leq 1\%$ sin bastones de Auer	$< 5\%$		Displasia unilínea o multilínea en $<10\%$ de células + alteración citogenética

\*La CDRM se subdivide en CRDM con sideroblastos en anillo según éstos sean  $> 15\%$  o  $< 15\%$

CRDU: citopenia refractaria con displasia unilínea; CRDM: citopenia refractaria con displasia multilínea; ARS: anemia refractaria con sideroblastos; AREB: anemia refractaria con exceso de blastos.

### **1.3.2. Trombocitopenia de origen periférico. TROMBOCITOPENIA INMUNE (PTI)**

La trombocitopenia periférica se produce por consumo o por destrucción de las plaquetas. Dentro de este último grupo se ha incluido a la Trombocitopenia Inmune.

La Trombocitopenia Inmune (PTI), antes conocida como Púrpura Trombocitopénica Idiopática, es una enfermedad autoinmune adquirida caracterizada por una trombocitopenia aislada (recuento de plaquetas  $<100 \times 10^9/L$ ), con grandes variaciones en el número, en la actividad de las plaquetas y en sus manifestaciones clínicas y cuyo diagnóstico es por exclusión [24].

Durante muchos años se asumió que el único mecanismo etiopatogénico involucrado en la PTI era la destrucción periférica de las plaquetas mediada por autoanticuerpos contra las glicoproteínas plaquetarias. Sin embargo, la ausencia de autoanticuerpos detectables en un numeroso grupo de pacientes de PTI sugirió la existencia de otros mecanismos responsables de la enfermedad, como por ejemplo la disregulación de la megacariopoyesis [24]. En los años 80 se realizaron estudios de cinética plaquetaria con plaquetas autólogas marcadas con isótopos radioactivos que demostraron que los pacientes con PTI tenían además una disminución en la producción plaquetaria [25, 26]. Los mecanismos implicados en esta última serían, por un lado, la acción de esos autoanticuerpos sobre los megacariocitos de la médula ósea y, por otro, los niveles alterados de TPO endógena [27, 28]

La incidencia de la PTI varía según las series publicadas, pero se considera en general una enfermedad rara. Según el Registro del Reino Unido, se estima en 3,9 por cada 100.000 personas-año [29, 30]. No hay diferencias entre ambos sexos, excepto en

edades comprendidas entre 30 y 60 años, donde es más prevalente en mujeres [31] [32].

La PTI se puede clasificar en función de la edad de aparición (niños y adultos), o por el tiempo transcurrido tras el diagnóstico (*de novo*, persistente o crónica) [33, 34].

Existen grandes variaciones en la forma de presentación de la enfermedad, en la cifra de plaquetas y en su curso clínico. Generalmente, cursa con sangrados cutáneo-mucosos leves (petequias, equimosis, epistaxis), aunque algunos pacientes pueden presentar sintomatología más grave como hemorragia intracraneal. Los pacientes con recuentos de plaquetas superiores a  $50 \times 10^9/L$  suelen estar asintomáticos y no requieren tratamiento. La enfermedad conlleva igualmente un importante deterioro de la calidad de vida del paciente, debido a los propios síntomas físicos, así como a la menor actividad social y laboral [35] [36].

El tratamiento está indicado en pacientes con cifras plaquetarias inferiores a  $30 \times 10^9/L$ , así como en aquellos con plaquetas entre  $30-50 \times 10^9/L$  que presenten sangrado o que vayan a someterse a procedimientos invasivos [33, 34]. Actualmente, existen tratamientos efectivos para mantener cifras de plaquetas seguras, basados bien en disminuir la destrucción periférica o bien en aumentar su producción.

Conviene destacar que un 9% de los pacientes adultos pueden tener una remisión espontánea (por lo general en los primeros 3-6 meses tras el diagnóstico) y entre un 3 y un 15% de los mismos desarrollará una enfermedad autoinmune sistémica en los siguientes años [34].

#### **1.3.2.1. Etiopatogenia**

En 1951, Harrington y Hollingsworth, describieron el caso de un recién nacido con púrpura cuya madre estaba diagnosticada de PTI [37]. Los autores sospecharon que el causante de su enfermedad podría ser algún factor que pasaba de la madre al feto. Para comprobar esta hipótesis, Harrington, se infundió 500 mL. de sangre de un enfermo con PTI. A las 10 horas, su cifra de plaquetas descendió por debajo de  $10 \times 10^9/L$ , acompañándose de fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, confusión y petequias. Las plaquetas permanecieron bajas durante cuatro días volviendo a la normalidad en el quinto día [38, 39]. Este hallazgo fue posteriormente confirmado realizando este mismo experimento en otros sujetos sanos y los resultados pusieron de manifiesto que la destrucción plaquetaria era debida a un factor que se encontraba en el suero de estos pacientes, al que denominaron factor trombocitopénico [40]. Más tarde se identificó que este factor eran anticuerpos antiplaquetas [41].

Estos anticuerpos, generalmente IgG, van dirigidos contra diferentes fragmentos de las GPs de la membrana plaquetaria, normalmente la GPIIb/IIIa y la GPIb/IX, y no frente a la molécula completa [42-44]. En un 50% de los pacientes con PTI estos autoanticuerpos no se detectan, lo cual podría explicarse por varias razones, entre otras, la posibilidad de obtener falsos negativos con las técnicas utilizadas (que sólo detectan anticuerpos dirigidos contra la GPIIb/IIIa y la GPIb/IX y no contra otras proteínas de membrana), la eliminación de estos anticuerpos por parte de los megacariocitos, o la posible implicación de otros mecanismos diferentes de la inmunidad mediada por anticuerpos en la etiopatogenia de la trombocitopenia [43].

Por otro lado, los anticuerpos contra las GPs de membrana plaquetaria pueden estar elevados tanto en pacientes con trombocitopenia inmune como no inmune.

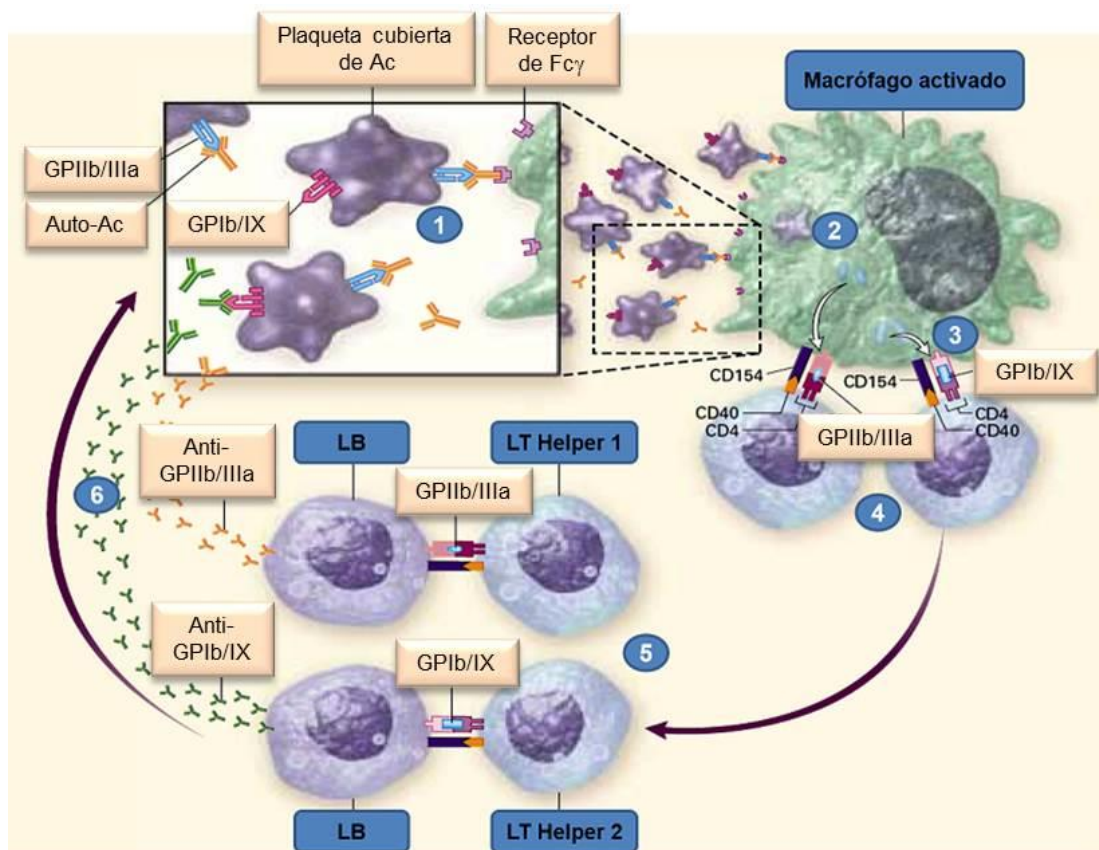
Finalmente, en algunos pacientes con trombocitopenia inmune, pueden seguir detectándose anticuerpos aun cuando la enfermedad ha remitido.

Por todo lo anteriormente expuesto, las recientes guías para el diagnóstico y tratamiento de la PTI no recomiendan la detección de anticuerpos como técnica diagnóstica [34].

El desencadenante de este proceso autoinmune es aún desconocido, aunque hay evidencias de que un proceso infeccioso o inflamatorio es el que inicia la PTI. Así, varios agentes infecciosos se han visto implicados en el desarrollo de la enfermedad, tales como *H. pylori*, el virus de hepatitis C o el VIH [45]. Estas infecciones iniciarían y perpetuarían la enfermedad mediante reactividad cruzada entre algún antígeno del agente etiológico de la infección y la membrana plaquetaria.

Se cree que en determinadas circunstancias, como en las infecciones o por la administración de vacunas, las células presentadoras de antígenos (CPA) podrían exponer a las células T fragmentos de las GPs de la membrana plaquetaria, que junto con el HLA-DR, estimularían el receptor de TCR (receptor de linfocitos T) de los linfocitos T helper. Una vez activados, estos linfocitos T helper sobreexpresan el CD40 ligando (CD40L) o CD154 que se une al CD40 localizado en la membrana de los linfocitos B. Esta interacción entre CD40/CD40L genera un conjunto de señales intracelulares que estimulan la secreción de numerosos mediadores y la síntesis de proteínas de membrana que participan en la inmunidad humoral, celular y en la

inflamación. Los primeros efectos descritos y mejor conocidos del sistema CD40/CD40L son la proliferación, la diferenciación y el cambio de clase de inmunoglobulina del linfocito B. También participa en la estimulación de las CPA y del linfocito T. Todo ello conduce a una activación, proliferación y diferenciación de LB y, por tanto, la síntesis de anticuerpos antiplaquetas.



**Figura 10. Destrucción de plaquetas mediada por anticuerpos.** En la figura se representan las diferentes fases en la producción de anticuerpos y la destrucción de las plaquetas opsonizadas. (Adaptado de Cines DB, Blanchette VS. *N Engl J Med* 2002; 346:995-1008)

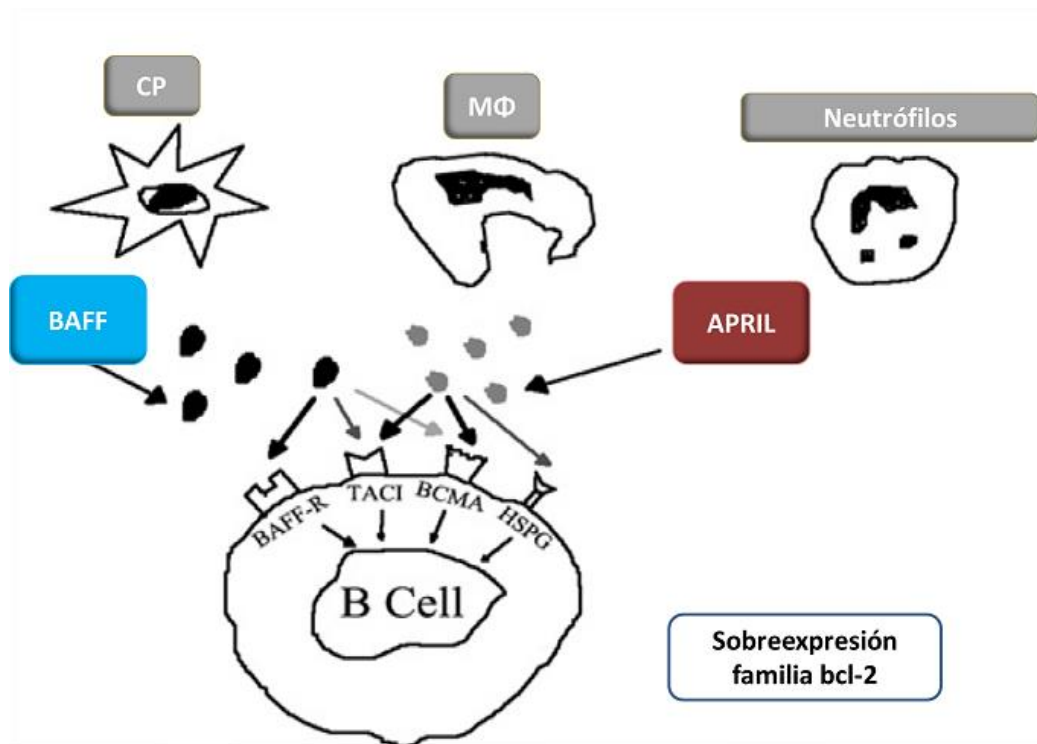
Asimismo, una disregulación de diversas citoquinas como el BAFF (también conocido por sus siglas en inglés como BLyS, factor activador linfocitos B) y del APRIL (Ligando inductor de la proliferación del linfocito B) se han implicado en la etiopatogenia de la



PTI. Estas citoquinas pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral y son producidas por células del sistema inmune como polimorfonucleares, células dendríticas, macrófagos, células estromales, linfocitos T activados y linfocitos B aberrantes.

El BAFF se une a tres receptores diferentes que se encuentran en la superficie de los linfocitos B, estos son: el BAFF-R (receptor para el BAFF), el antígeno de maduración de células B (BCMA) y al TACI (del inglés *calcium modulator ligand interactor*); por su parte el APRIL se une al BCMA, al TACI y al HSPG. La interacción del BAFF con sus receptores lleva a una sobreexpresión de diferentes miembros de la familia antiapoptótica bcl-2. Todos estos mecanismos pueden promover un aumento en la proliferación, maduración y supervivencia de los linfocitos B.

Una sobreexpresión del BAFF evita la apoptosis de los linfocitos B, favoreciendo la aparición de enfermedades autoinmunes. Niveles elevados de BAFF y APRIL se han encontrado tanto en el suero como en los órganos diana de diversas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, el Lupus Eritematoso Sistémico y el Síndrome de Sjögren primario.



**Figura 11. Interacciones entre las células de la inmunidad innata y los linfocitos B.** En la figura vemos cómo diferentes células de la inmunidad innata, células plasmáticas (CP), los macrófagos (MΦ) y los neutrófilos, producen diferentes citoquinas como el BAFF o el APRIL que se unen a receptores de la membrana del linfocito B produciendo una proliferación y maduración del mismo.

Como mencionábamos anteriormente, se ha especulado que, además de la producción de autoanticuerpos, otros mecanismos podrían estar implicados en la etiopatogenia de la PTI. Varios trabajos han demostrado que en estos pacientes hay una disminución en el número de linfocitos T cooperadores (CD4+) y un aumento de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) que van dirigidos contra diferentes antígenos de la membrana plaquetaria, fundamentalmente contra la GPIIb/IIIa [46].

Además en otros estudios se ha mostrado que los pacientes con PTI crónica frecuentemente presentan un incremento en el ratio Th1/Th2 con expansión oligoclonal de células T [47].

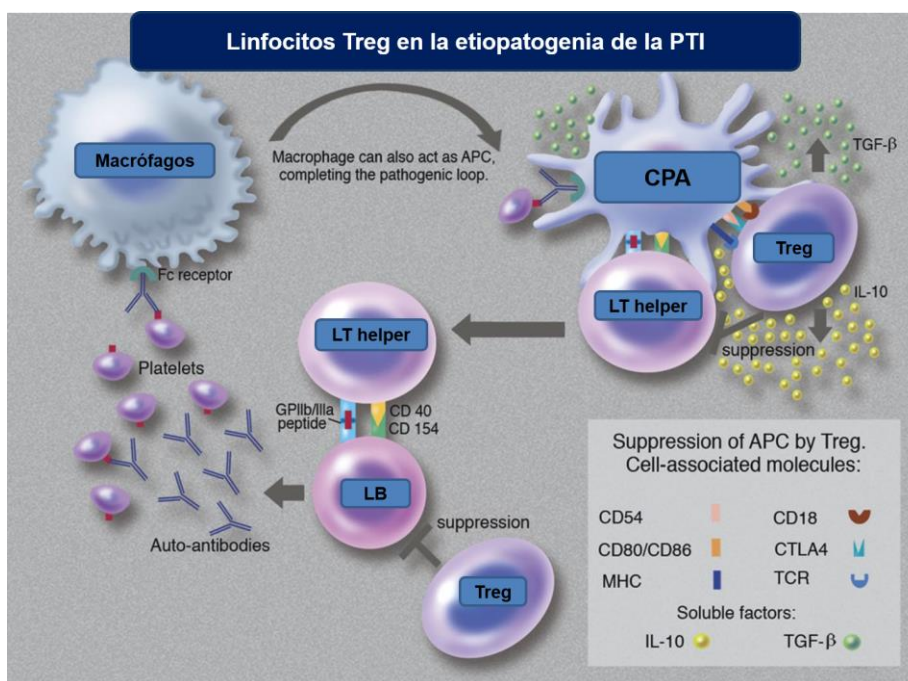
La aparición tanto de anticuerpos antiplaquetarios como de linfocitos T citotóxicos pone de manifiesto la pérdida de tolerancia del sistema inmune a los antígenos propios.

Varios estudios han buscado la justificación a esa pérdida de tolerancia en los linfocitos T reguladores (Treg). Los Treg es una población de linfocitos T CD4+, que se identifican por la alta concentración de CD25 en su superficie y otros marcadores como el factor de transcripción FOXP3, y los antígenos CD45RB y CTLA-4 (antígeno-4 de linfocitos T citotóxicos). La principal función de los Treg es mantener la tolerancia interaccionando con las CPA, los Th y los LB y por lo tanto previniendo la aparición de enfermedades autoinmunes como la PTI [48].

En los pacientes con PTI tanto los Th como los LB eluden la vigilancia de los Treg, permitiéndose que los Th induzcan la activación y proliferación de los LB y estos la producción de autoanticuerpos contra los antígenos GPIIb/IIIa y/o GPIb-IX de la superficie plaquetaria. Posteriormente, estas plaquetas opsonizadas por autoanticuerpos, son capturadas por los macrófagos esplénicos a través de los receptores para la fracción constante de las Ig (FcγRs) siendo fagocitadas por los macrófagos del sistema retículoendotelial (SRE) tanto del bazo como del hígado. A su vez estos macrófagos esplénicos y hepáticos también pueden actuar como CPA, presentando estos péptidos o fragmentos de antígenos GPIIb/IIIa y/o GPIb-IX a las células Th. Una vez activados, las CPA y los Th producen una serie de citoquinas proinflamatorias tales como la interleucina 6 (IL6), interleucina 10 (IL10), sobreexpresando el CD154 o CD40L y activando a los linfocitos B, los cuales producen

de nuevo anticuerpos contra los antígenos plaquetarios, opsonizando las plaquetas que son destruidas en el SRE, cerrando así el círculo.

En resumen, podríamos decir que la PTI ocurre porque las CPA, los macrófagos, los Th y los LB escapan al control inmune de los Treg, modificándose así las funciones y el número de las células previamente citadas. Las interacciones entre estos tipos celulares son esenciales en los mecanismos etiopatogénicos de la PTI. Dichas interacciones son mediadas y potenciadas por varias moléculas de superficie, como son el receptor de los linfocitos T para el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), el B7–CD28–citotóxico, el CTLA-4, el CD40–CD40L y el Fas–FasL [49].

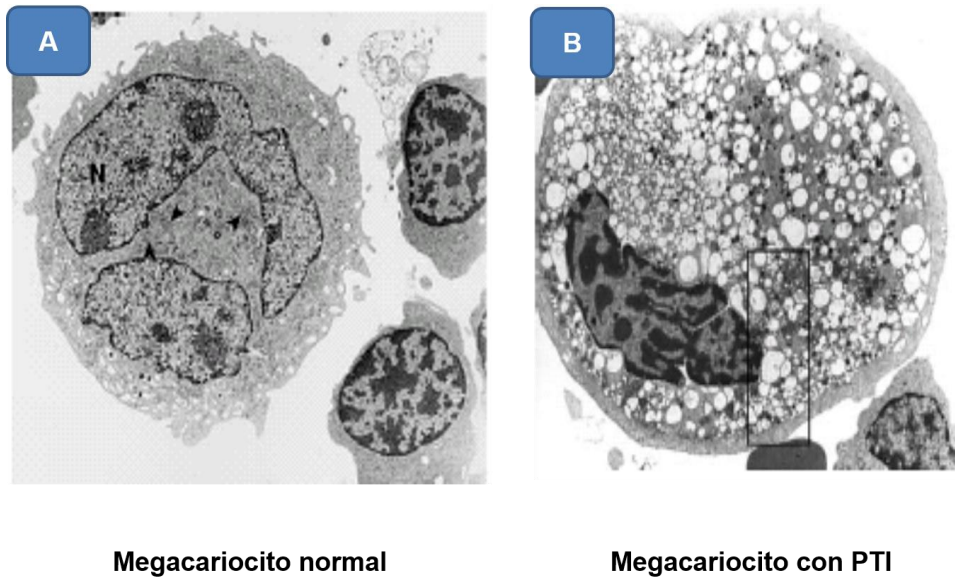


**Figura 12. Interacciones entre las células implicadas en la respuesta inmune en los pacientes con PTI.** En esta figura se muestran las interacciones entre las células Treg con los LT helper, las CPA y los LB, y cómo en los pacientes con PTI estos linfocitos Treg permiten que los Th induzcan la activación y proliferación de los LB y posteriormente la producción de autoanticuerpos contra los antígenos GPIIb/IIIa y/o GPIb-IX de la superficie plaquetaria. (Adaptado de “ITP: Tregs come to the rescue” Blood 2010; 116:4388-4390)

Diferentes estudios han demostrado que el bazo es el principal órgano de producción de anticuerpos y de eliminación de las plaquetas opsonizadas, previamente unidas a los macrófagos a través de los receptores para la Fc de las inmunoglobulinas. Los receptores para la Fc de las inmunoglobulinas implicados en el aclaramiento plaquetario en los pacientes con PTI son los de baja afinidad, FcγRIIA y FcγRIIIA. Algunos autores han encontrado más frecuentemente ciertos polimorfismos como FcγRIIA-131H y FcγRIIIA-158V en pacientes con PTI [50-52].

Además del aumento en la destrucción plaquetaria que se produce en estos pacientes, existe también una disminución en su producción. Debido a que los antígenos GPIIb/IIIa y GPIb/IX se encuentran también en la superficie de los megacariocitos, los anticuerpos se unen a los mismos dando como resultado una megacariopoyesis alterada [44]. Varios estudios han demostrado que dichos autoanticuerpos inhiben la proliferación y maduración de los megacariocitos, así como la liberación de plaquetas [53, 54].

Estudios de microscopía electrónica han puesto de manifiesto las alteraciones producidas por estos anticuerpos en los megacariocitos de médula ósea como el aumento del tamaño mitocondrial con vacuolización citoplasmática, la distensión de membranas y la condensación de la cromatina nuclear [55] [56].



**Figura 13. Características estructurales de la apoptosis en las plaquetas de pacientes con PTI.** (A) Se muestra un megacarioblasto normal (megacariocito en fase I) con núcleo lobulado (N); en el citoplasma se puede observar un sistema característico de delimitación de la membrana (asteriscos) y mitocondrias normales (punta de las flechas). (B) Megacariocito maduro de un paciente con PTI que muestra características ultraestructurales de para-apoptosis. (Adaptada de Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJ, et al. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2004;103:500-506)

#### 1.3.2.2. Terminología

Ante la aparición de nuevos tratamientos para la enfermedad y la existencia de numerosos ensayos clínicos relacionados con diferentes aspectos de la misma, en 2009 se reunió un grupo de reconocidos expertos en PTI para armonizar las definiciones y los criterios de respuesta [33].

Se decidió cambiar el término “idiopática” por “inmune”, con el fin de enfatizar este mecanismo etiopatogénico como responsable de la enfermedad. Asimismo, se eliminó la palabra “púrpura”, ya que una gran proporción de enfermos están asintomáticos. El acrónimo PTI (en inglés *ITP*) se mantuvo por su utilidad para las búsquedas bibliográficas ya que está ampliamente extendido.

Igualmente, se estableció  $>100 \times 10^9/L$  como cifra límite de plaquetas para el diagnóstico de la enfermedad. Así, se distinguió entre:

**PTI primaria:** Enfermedad autoinmune que se caracteriza por trombocitopenia aislada (recuento  $<100 \times 10^9/L$ ) sin identificarse ninguna causa ni patología que la justifique. El diagnóstico se hace por exclusión y cursa con un aumento del riesgo de hemorragia, aunque no siempre existe clínica hemorrágica.

**PTI secundaria:** Todas las formas de trombocitopenia de mecanismo autoinmune, exceptuando la PTI primaria. En estos casos el acrónimo PTI debería ir seguido del nombre de la enfermedad asociada entre paréntesis, por ejemplo la trombocitopenia asociada a lupus, se pondría como “trombocitopenia secundaria (lupus asociada)” o “trombocitopenia asociada a lupus”.

En cuanto a las fases de la enfermedad se diferenciaron las siguientes:

**PTI de nuevo diagnóstico:**  $<3$  meses de evolución.

**PTI persistente:** 3-12 meses desde el diagnóstico. Engloba a los pacientes que no consiguen una remisión espontánea o que no mantienen la respuesta tras el fin de la primera línea de tratamiento. Se introduce este nuevo concepto porque la posibilidad de remisiones espontáneas es importante durante este período, pudiendo considerarse el aplazamiento de aproximaciones terapéuticas más agresivas como la esplenectomía.

**PTI crónica:**  $>12$  meses de evolución.

Se habla de **PTI grave** cuando sucede una hemorragia importante que obliga a iniciar o a modificar el tratamiento.

#### **1.3.2.3. Manifestaciones clínicas**

Las manifestaciones clínicas se caracterizan por sangrado mucocutáneo y son muy variables, desde pacientes asintomáticos o con equimosis de pequeña cuantía, hasta pacientes con hemorragias de riesgo vital como, entre otras, hemorragias cerebrales o gastrointestinales.

La cifra de plaquetas se correlaciona con las manifestaciones hemorrágicas, aunque no es el único factor que interviene. Así, la edad del paciente, su estilo de vida u otros factores como la presencia de uremia, pueden contribuir igualmente al sangrado [31].

En adultos el comienzo suele ser insidioso y generalmente tiene un curso crónico [57]. Sin embargo, en niños suele ser autolimitada y al menos dos tercios se recuperan espontáneamente en seis meses [58].

Varios estudios han comunicado tasas de mortalidad 1,3 a 2,2 veces mayor en los pacientes con PTI que en la población normal. Aunque la muerte por hemorragia es la mayor preocupación en estos pacientes, la mortalidad es baja [59]. Sin embargo, los pacientes mayores de 60 años y aquellos con hemorragias previas tienen mayor riesgo de sangrado [60]. Sangrado e infección, como efectos secundarios del tratamiento, contribuyen por igual a la mortalidad [61].

#### **1.3.2.4. Diagnóstico**

El diagnóstico de PTI se hace una vez excluidas otras causas de trombocitopenia. La aproximación inicial se basa en la historia clínica, la exploración física, el hemograma y



el examen de la extensión de sangre periférica, prestando especial atención a la existencia de esquistocitos o blastos, con el fin de descartar patologías de riesgo vital como la trombocitopenia microangiopática o la leucemia aguda [62]. Es importante destacar que aproximadamente el 20% de las trombocitopenias inmunes se asocian a otros procesos subyacentes [63, 64].

**Tabla 4. Test diagnósticos recomendados para el diagnóstico en pacientes con PTI.**

<b>Estudios sistemáticos básicos</b>	Hemograma con reticulocitos
	Extensión de sangre periférica
	Estudio de coagulación
	Bioquímica básica de sangre y orina
	Dosificación de inmunoglobulinas
<b>Estudios de autoinmunidad</b>	Test de Coombs directo
	Anticuerpos antinucleares
<b>Estudios microbiológicos</b>	VIH, VHC, VHB
<b>Estudio de médula ósea<sup>1</sup></b>	Aspirado y biopsia
<b>Otros estudios a considerar según la evolución clínica</b>	Anticuerpos antifosfolípido
	Anticuerpos antitiroideos y pruebas de función tiroidea
	<i>H. pylori</i> : prueba del aliento o antígeno en heces
	Otras serologías

<sup>1</sup> Indicado en: pacientes >60 años; en pacientes refractarios al tratamiento de 1ª línea; en aquellos que presenten rasgos atípicos en sangre periférica; o previo a la realización de la esplenectomía.

### **1.3.2.5. Tratamiento**

El objetivo del tratamiento en la PTI es evitar o detener la hemorragia, manteniendo una cifra de plaquetas segura (superior a  $20\text{-}30 \times 10^9/\text{L}$ ).

Debe ser un tratamiento personalizado, ajustado a las características del paciente.

Para ello, deben valorarse múltiples aspectos como la edad, la presencia de comorbilidades que predispongan al sangrado o a fenómenos trombóticos, la actividad física y el estilo de vida, la capacidad para tolerar los efectos adversos del tratamiento, la accesibilidad a un centro de tratamiento, la preocupación o ansiedad por la enfermedad, la toma de otro tipo de medicación que favorezca el sangrado, etc. [34]

Los dos criterios para iniciar tratamiento son, por un lado, la presencia de manifestaciones clínicas hemorrágicas y, por otro, la cifra de plaquetas. Así:

- Pacientes con  $<20\text{-}30 \times 10^9/\text{L}$ , serán candidatos a recibir tratamiento independientemente de sus manifestaciones hemorrágicas [34, 64]
- Los pacientes con recuentos de plaquetas entre  $30\text{-}50 \times 10^9/\text{L}$  no suelen tener complicaciones hemorrágicas y, en general, no recibirán tratamiento, excepto aquellos que presenten hemorragia, vayan a ser intervenidos quirúrgicamente o se les vaya a someter a procedimientos invasivos como la colocación de un catéter venoso, una punción lumbar, etc.
- El tratamiento de pacientes con recuentos superiores a  $50 \times 10^9/\text{L}$  está raramente indicado y se reserva para aquellos pacientes en los que se dan circunstancias especiales, entre otras, la necesidad de recibir tratamiento anticoagulantes a dosis plenas por alguna otra patología, la asociación de alguna coagulopatía o disfunción plaquetaria, o en aquellos que se vayan a

someter a procedimientos quirúrgicos que supongan un alto riesgo de sangrado como la cirugía a nivel del SNC o la cirugía ocular [34, 64].

En este sentido, se establecen varias líneas de tratamiento:

### **Primera línea.**

#### **Glucocorticoides**

El tratamiento de primera línea son los **glucocorticoides** (**prednisona** –PRD- a 1 mg/kg o **dexametasona** –DXM- a 40 mg/día durante 4 días, cada 2 semanas y hasta 3 ciclos). La principal ventaja de DXM con respecto a PRD, es que la duración del tratamiento es menor, lo que conlleva un mejor cumplimiento por parte del paciente, la administración de una dosis total de corticoides menor y, probablemente, una respuesta más rápida y de mayor duración [65, 66].

La tasa de respuesta a PRD, que es el corticoide más usado, oscila entre un 40-70% a los 5-10 días, manteniéndose a largo plazo únicamente en un 30% de los casos. Los corticoides se deben retirar en un plazo de 4 a 6 semanas, ya que mantener dosis de PRD superiores a 5-10 mg durante más tiempo puede provocar efectos adversos graves.

#### **Inmunoglobulinas intravenosas (IGIV)**

En general se suelen administrar asociadas a glucocorticoides en pacientes con hemorragia grave en los que se requiere una respuesta rápida. La dosis recomendada es de 1g/kg durante 2 días ó 0,4 g/kg/día durante 5 días. Se obtienen respuestas transitorias en torno al 90% pero limitadas a 2-6 semanas.

En caso de que el tratamiento con glucocorticoides esté absolutamente contraindicado (psicosis o diabetes no controlada con el tratamiento adecuado), se puede recurrir a las IGIV en primera línea y valorar posteriormente alguna de las opciones de tratamiento de segunda línea [64].

### **Segunda línea.**

El objetivo de los tratamientos de segunda línea es alcanzar una cifra de plaquetas segura de forma mantenida, con los mínimos efectos adversos. La esplenectomía, así como un gran arsenal de fármacos con diferentes mecanismos de acción han sido utilizados como tratamiento de segunda línea en PTI.

Las opciones terapéuticas de segunda línea se pueden dividir, de forma global, en tratamientos que se administran una sola vez o mediante un solo ciclo (esplenectomía, anti-CD20 -Rituximab-), y aquellos que necesitan de una administración continuada (como los agentes inmunosupresores o los agonistas del receptor de la trombopoyetina -AR-TPO-).

### **Esplenectomía.**

Se considera el tratamiento con mayor tasa de remisiones completas duraderas. No obstante, se han descrito remisiones espontáneas de la enfermedad, por lo que la esplenectomía se debe retrasar un mínimo de seis meses. Por este motivo, Rodeghiero introdujo el concepto de PTI persistente, para esperar la probable remisión espontánea antes de realizar tratamientos más agresivos como la esplenectomía [33].

Con este procedimiento se obtiene respuesta en un 80% de los pacientes, manteniéndose esta respuesta a los cinco años en aproximadamente dos tercios de los casos, sin que se hayan definido factores predictivos para la misma [67].

El tiempo para alcanzar la respuesta oscila entre 1 y 24 días. La mortalidad relacionada con el procedimiento es del 1 y del 0,2%, en función de que se realice por laparotomía o por vía laparoscópica [61, 68] .

No se han definido contraindicaciones específicas para la esplenectomía en pacientes con PTI, aunque la tasa de morbilidad del procedimiento aumenta en relación con diversos factores como la obesidad, la edad avanzada o la pluripatología crónica.

Se recomienda la vacunación frente a bacterias encapsuladas antes de llevar a cabo una esplenectomía, así como informar debidamente al paciente acerca de cómo actuar ante la sospecha de un cuadro séptico.

#### **Fármacos inmunosupresores.**

Diversos fármacos inmunosupresores se han venido utilizando en el tratamiento de estos pacientes, como la Azatioprina, la Ciclosporina A, la Ciclofosfamida, el Danazol, la Dapsona, el Micofenolato o el Rituximab.

En este apartado se destacará el **Rituximab**, anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra el receptor CD20 de los linfocitos B, que durante la última década se ha empleado en pacientes con PTI refractaria.

En general, se utiliza a una dosis de 375 mg/m<sup>2</sup>/semana durante 4 semanas, aunque la dosis adecuada para PTI es aún desconocida [69-71]. Dosis más bajas (100

mg/m<sup>2</sup>/semana durante 4 semanas) también son efectivas, aunque se tarda más tiempo en alcanzar la respuesta.

Responden aproximadamente un 60% de los pacientes, alcanzando respuesta completa un 40% de ellos. No obstante, únicamente un 15-20% de los respondedores mantiene una respuesta sostenida durante más de 3-5 años. La respuesta ocurre entre la 1ª-2ª semanas, pudiendo producirse hasta la 6ª u 8ª semanas después de iniciarse el tratamiento. La mayoría de los pacientes cuya respuesta es de una duración superior a un año, responderán nuevamente a tratamiento con Rituximab en caso de recaída. Se ha observado una mayor tasa de respuesta cuando se combina Rituximab con altas dosis de DXM como tratamiento inicial [72].

Rituximab debe administrarse con precaución en pacientes con VHB positivo, ya que podría reactivarse la enfermedad pudiendo desencadenar una hepatitis fulminante. Otro efecto adverso grave es el desarrollo de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). En este sentido, se han descrito más de 50 casos de pacientes con LNH tratados con Rituximab, varios de ellos cuando se utiliza el fármaco en enfermedades autoinmunes como PTI [73] .

La mayoría de los autores destacan que Rituximab debe utilizarse con precaución en PTI, debido a que los datos disponibles provienen de estudios no controlados, a que no tiene indicación aprobada para su uso en pacientes con PTI, y a que puede tener efectos secundarios graves como los referidos anteriormente [74].

**Agonistas de la trombopoyetina.**

En 1994 tras la purificación y clonación de la TPO humana, se consiguieron dos moléculas recombinantes: la conocida como trombopoyetina recombinante humana (del inglés *recombinant human thrombopoietin, rhTPO*) y el factor de crecimiento de los megacariocitos recombinante y pegilado, (del inglés *pegylated human recombinant megakaryocyte growth and development factor, PEG-rHuMGDF*). Estas moléculas se comenzaron a utilizar para el tratamiento de la PTI con un mecanismo de acción totalmente diferente a los tratamientos utilizados hasta entonces ya que no disminuyen la destrucción plaquetaria sino que aumentan su producción, estimulando el receptor de la trombopoyetina.

Se realizaron diferentes ensayos clínicos con estos agentes en pacientes con trombocitopenias de diferentes etiologías con muy buenos resultados. Sin embargo, en 1998 se suspendió radicalmente la utilización de ambas moléculas al comprobarse que algunos sujetos tratados con PEG-rHuMGDF desarrollaron una intensa trombocitopenia debida a la aparición de un anticuerpo contra el PEG-rHuMGDF con reactividad cruzada con la trombopoyetina endógena (eTPO), el cual era capaz de neutralizar la misma [75]. Dados los importantes beneficios clínicos comprobados con los agentes trombopoyéticos de primera generación, se trabajó durante años para conseguir otras moléculas con estas propiedades pero menos inmunogénicas. Así surgieron dos nuevos productos con capacidad de estimular la trombopoyesis pero con características fisicoquímicas y aspectos funcionales distintos. Estos son el AMG 531, Romiplostim, y el Eltrombopag [76].

Actualmente ambos agonistas están aprobados por AEMPS para pacientes adultos con PTI crónica esplenectomizados que son refractarios a otros tratamientos (por ejemplo corticoides e inmunoglobulinas). Se pueden utilizar también como segunda línea de tratamiento en pacientes adultos no esplenectomizados en los que la cirugía esté contraindicada o no acepten su realización. En este grupo de pacientes, los agonistas son los fármacos de elección por su eficacia y excelente perfil de seguridad [64], únicos con un grado de recomendación A según las Guías Internacionales [34].

El AMG 531 (Romiplostim) es una proteína recombinante compuesta por dos dominios. Un dominio peptídico, que es el sitio de unión al receptor de la eTPO y un dominio transportador constituido por dos fragmentos Fc de IgG1, que prolonga notablemente su vida media en la circulación. El dominio peptídico no tiene homología con la eTPO lo cual evita la aparición de anticuerpos que la neutralicen. Por su unión al receptor *myeloproliferative leukemia receptor* (Mpl) estimula el crecimiento y la maduración de los megacariocitos de la misma manera que la eTPO, vía JAK2, STAT5, P38 MAPK y AKT. Las respuestas al fármaco varían mucho de unos pacientes a otros, e incluso dentro del mismo individuo, por lo que hay que hacer múltiples ajustes de dosis. La sensibilidad a estos agentes puede verse modificada a lo largo del tiempo.

La dosis de Romiplostim es de 1 a 10 µg/kg de peso ajustado al recuento plaquetario alcanzado según se especifica en ficha técnica (<http://www.ema.europa.eu/>)

La tasa de respuesta se ha estimado en 79% en pacientes esplenectomizados y 88% en no esplenectomizados. Hasta un 87% de los pacientes son capaces de retirar o disminuir la medicación concomitante para el tratamiento de la PTI [77]. En los últimos



estudios se ha observado que un pequeño porcentaje de pacientes, en torno a un tercio, mantienen la respuesta al suspender el agonista [78].

Esto pone de manifiesto que estos fármacos pueden tener otro mecanismo etiopatogénico, quizás inmunosupresor, bien restaurando la correcta función de los linfocitos Treg o bien disminuyendo los niveles de APRIL [79-81].

Recientemente, se han publicado los datos de seguridad de uso de Romiplostim durante un seguimiento de cinco años, confirmando su baja incidencia en la aparición de efectos adversos graves. Las reacciones adversas más frecuentes incluyen reacciones de hipersensibilidad y cefalea, y como efectos adversos graves se describen eventos trombóticos, fibrosis reticulínica y neoplasias hematológicas o tumores sólidos [82].

Por otra parte, Eltrombopag es una molécula no peptídica extremadamente pequeña con un peso molecular de 546 kD. Es activa por vía oral. Se une a la porción transmembrana del receptor de la TPO en vez de al sitio de unión de la rh-TPO o de los péptidomiméticos como el Romiplostim. Produce una dimerización del receptor y da lugar a un mecanismo inmediato de transmisión de la señal a través fundamentalmente de la vía JAK2 y STAT. Todo esto hace que su efecto sea independiente al de la TPO y tenga un efecto aditivo.

Para su correcta absorción debe administrarse en ayunas y hay que tener en cuenta su interacción con otros fármacos como antiácidos, calcio o suplementos vitamínicos. Se administra por vía oral a la dosis inicial de 50 mg al día, salvo en pacientes de origen asiático o con insuficiencia hepática grave, en los que se comenzará con 25 mg al día.

La dosis de mantenimiento de Eltrombopag oscilará entre 25 y 75 mg/día. Para verificar su efecto se debe mantener una dosis diaria durante cinco días. El aumento del recuento de plaquetas se observa al séptimo día, mientras que la respuesta se alcanza aproximadamente a los dieciséis días del inicio del tratamiento (<http://www.ema.europa.eu/>). Su tasa de respuesta es similar al de Romiplostim [83].

Actualmente está en marcha un estudio para evaluar la seguridad a largo plazo con el Eltrombopag. La mayoría de los efectos secundarios comunicados son leves, destacando la cefalea moderada. Efectos adversos más graves fueron: cataratas que sólo se describieron en estudios preclínicos, eventos tromboembólicos en un 5%, alteraciones de la función hepática en un 2% y en su mayoría leves, grados 1-2, asintomáticos y reversibles tras suprimir el fármaco, fibrosis de médula ósea en un 3% sin asociarse en ningún caso a disfunción medular y neoplasias hematológicas, que no parecen aumentar por el uso del fármaco [84].

## **2. HIPÓTESIS**



La trombocitopenia es uno de los mayores determinantes del riesgo de sangrado. Sin embargo la sintomatología hemorrágica no siempre se correlaciona con la cifra de plaquetas. Es conocido que algunos pacientes con PTI que presentan trombocitopenia grave no tienen manifestaciones hemorrágicas tan frecuentes ni tan importantes como cabría esperar. De hecho, los pacientes con PTI presentan menor sangrado a pesar de tener recuentos de plaquetas tan bajos como los observados en pacientes con trombocitopenia de origen central (TPC) por ejemplo, post-quimioterapia (TP-PQ) o SMD.

Por lo tanto existe la posibilidad de que las trombocitopenias de diferentes etiologías presenten distintas características. Esto podría deberse a diferencias funcionales de las plaquetas producidas o a factores plasmáticos tales como factores de crecimiento de los megacariocitos, activadores linfocitarios y proteínas participantes en la coagulación.

Pensamos que el análisis comparativo de la regulación del número de plaquetas y de la megacariopoyesis así como de la función plaquetaria y de la capacidad procoagulante del plasma entre pacientes con PTI, pacientes con trombocitopenia central (ya sea postquimioterapia o por disfunción de médula ósea como en SMD) e individuos sanos podría ser útil para identificar las alteraciones moleculares implicadas en el fenotipo hemorrágico.



### **3. OBJETIVO**





El objetivo de este trabajo es estudiar las diferentes características en la hemostasia de pacientes con trombocitopenia de origen periférico (PTI) y central (pacientes post-tratamiento con quimioterapia y SMD) que nos permita dilucidar por qué, a igual grado de trombocitopenia, los pacientes con PTI presentan menos manifestaciones hemorrágicas. En este estudio incluiremos también un grupo control de pacientes sanos y otro de pacientes con PTI y número normal de plaquetas.

Este objetivo primario se subdividirá en:

- El estudio de la regulación del número de plaquetas por trombopoyetina y la producción de plaquetas inmaduras en pacientes con PTI y en pacientes con TPC.
- El estudio de las características funcionales de las plaquetas en nuestras cohortes de pacientes y en controles, determinando la capacidad de activación de las plaquetas inducida por agonistas (TRAP). Esto se evaluará mediante la expresión de diferentes marcadores de activación tales como cambios en la conformación del receptor de Fg y en la exposición de P-selectina. También determinaremos el grado de apoptosis en las plaquetas de pacientes con PTI y TPC para averiguar si este mecanismo puede ser una de las causas de la trombocitopenia y disfunción plaquetaria en estos pacientes.
- El estudio de la capacidad procoagulante del plasma y de las micropartículas (MPs) en los grupos incluidos. En este último caso determinaremos el número y la capacidad trombogénica de las MPs en pacientes con PTI y en pacientes con TPC y por otro caracterizaremos el origen celular de las mismas.

- El estudio del efecto del tratamiento con agentes estimulantes de la trombopoyesis sobre la hemostasia de pacientes con PTI. Para cumplir con este objetivo realizaremos el análisis detallado del subgrupo de pacientes con PTI tratados con agonistas del receptor de la trombopoyetina (AR-TPO). Se evaluará el efecto del tratamiento con AR-TPO en la funcionalidad plaquetaria, y el estado procoagulante antes y después de responder al tratamiento.
- La caracterización en los distintos grupos de la participación de la activación del sistema inmune en la destrucción de las plaquetas mediante la determinación de niveles plasmáticos de APRIL y el efecto de los AR-TPO sobre los mismos.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**



#### 4.1. Definición de los pacientes incluidos en el estudio

El estudio se llevó a cabo desde el año 2010 hasta 2014 en la Sección de Trombosis y Hemostasia del Hospital Universitario La Paz.

El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica, CEIC, del Hospital Universitario La Paz. Todos los individuos que se incluyeron fueron informados y firmaron el consentimiento de participación. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki. Se garantizó manejar la información respetando legislación española sobre códigos éticos de conducta (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal; y Ley 8/2001, del 13 de Julio, de Protección de datos de carácter personal en la Comunidad de Madrid).

Se incluyeron tres grupos de pacientes:

- El primer grupo lo constituyeron 35 pacientes con **trombocitopenia de origen central (TPC)**. Dentro de este grupo se incluyeron los que presentaban trombocitopenia post-quimioterapia (TP-PQ) y los que presentaban trombocitopenia como manifestación de un síndrome mielodisplásico (TP-SMD).

En el grupo de **TP-PQ** se incluyeron 17 pacientes con diferentes enfermedades hematológicas distintas a SMD: cuatro pacientes presentaban mieloma múltiple (MM), dos leucemia aguda mieloblástica (LAM), uno leucemia aguda

linfoblástica (LAL), dos linfoma de Hodgkin y el resto (8 pacientes) con linfoma no Hodgkin (LNH).

Por otra parte, en el grupo de **TP-SMD** se incluyeron 18 pacientes, todos ellos cumplían los criterios diagnósticos de SMD publicados por Valent y la clasificación de la OMS modificada en 2008, y además fueron clasificados por el IPSS [22, 23, 71].

- Ochenta y tres pacientes con **PTI crónica**, definida por Rodeghiero como recuento de plaquetas inferior a  $100 \times 10^9/L$  durante más de 12 meses con megacariocitos normales o aumentados en la médula ósea, sin evidencia morfológica de displasia y sin otras patologías que puedan explicar la trombocitopenia [33]. Dieciseis pacientes no habían precisado nunca tratamiento para la PTI y el resto habían recibido en algún momento tratamiento con IGIV, corticoides, esplenectomía, Rituximab, Romiplostim, Eltrombopag, Azatioprina o Dapsona, como se puede ver en la tabla nº 7. Sesenta y cuatro pacientes presentaban trombocitopenia (plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$ ) en el momento de la extracción de la muestra.

Se analizó específicamente un **subgrupo de pacientes tratados con AR-TPO** que estaba formado por 13 pacientes, el 57% de ellos eran mujeres, la media edad era de 59,7 años (rango 38-81). En esta última población, pacientes tratados con AR-TPO, se extrajeron dos muestras, una previa a recibir el tratamiento con los agonistas y otra tras obtener respuesta a los mismos. En la tabla nº 8 se muestran las características clínicas de los pacientes con anterioridad al tratamiento incluyendo el tipo de agonista, la dosis administrada a cada

paciente y el recuento de plaquetas alcanzado. Se incluyen también las características de tres pacientes en los que se cambió el agonista. Dos habían recibido previamente Romiplostim y se cambió el tratamiento a Eltrombopag, uno porque tuvo una depresión grave como efecto adverso (paciente nº6) y otro porque presentó dificultades para ajustar la dosis (paciente nº8). En el tercer paciente (nº 12) se sustituyó Eltrombopag por Romiplostim por pérdida de respuesta al primero.

- Como grupo control se incluyeron 87 personas sanas, de edades y distribución por sexo similar al grupo de pacientes incluidos en el estudio. Este grupo eran adultos que acudieron a la Unidad de Donantes de nuestro hospital.

#### **4.2. Criterios para la inclusión y exclusión de los pacientes en el estudio**

##### **4.2.1. Criterios de inclusión**

Los criterios de inclusión para cada una de las poblaciones estudiadas son los siguientes:

- **Grupo de pacientes con trombocitopenia central (TP-PQ y TP-SMD):** Todos con edad  $\geq 18$  años y que habían aceptado participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado.
  - **Pacientes con TP-PQ:** Neoplasia hematológica, distinta a SMD, en tratamiento con quimioterapia.
  - **Pacientes con TP-SMD:** Diagnóstico de SMD según los criterios y clasificación de la OMS-2008 [22]

- **Grupo de pacientes con PTI crónica:** diagnosticados de PTI crónica de acuerdo a las recomendaciones actuales [34, 64, 85]; con edad  $\geq 18$  años; y que habían aceptado participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado.
  - **El subgrupo de pacientes con PTI crónica que recibió tratamiento con los AR-TPO** cumplía todos los criterios de inclusión de los pacientes con PTI crónica. Además, en el momento de la extracción de la primera muestra (PTI-A), el recuento de plaquetas debía ser  $<30 \times 10^9/L$  para los pacientes que no tuvieran medicación concomitante y  $<65 \times 10^9/L$  para los que estaban en tratamiento con corticoides o IGIV.
- **Grupo de controles:** pacientes con edad  $\geq 18$  años y que habían aceptado participar en el estudio mediante la firma del consentimiento Informado.

#### **4.2.2. Criterios de exclusión comunes a todos los grupos:**

Los criterios de exclusión que se aplicaron a los pacientes considerados como candidatos a participar en el estudio fueron los siguientes:

- Estar en tratamiento con anticoagulantes o medicamentos que puedan afectar la hemostasia tales como antagonistas de la vitamina K, heparina, antiinflamatorios no esteroideos, anticonceptivos orales y antiagregantes en los diez días previos al estudio.
- Haber sido diagnosticados de trastorno de la coagulación o trombopatía.
- Haber recibido quimioterapia citotóxica el día de realización del estudio, previamente a la recogida de la muestra.



- Función renal o hepática alterada.
- HTA descontrolada.
- Hiperlipidemia.
- Coronariopatía o Enfermedad arterial periférica.
- Sujetos que habían recibido una transfusión de plaquetas en los quince días previos a la extracción.

#### **4.3. Extracción y preparación de las muestras**

Con objeto de evitar la influencia de los ciclos circadianos en las variables estudiadas, la hora de extracción fue la misma para todos los sujetos del estudio (entre las 9 y las 10 horas de la mañana).

A cada paciente se le extrajeron, por venopunción antecubital, 10 mL de sangre total en tubos de plástico de Vacutainer® (*BD, Becton Dickinson and Company, Madrid, Spain*). Siete mL se recogieron en tubos de citrato trisódico tamponado 3,8%, concentración 0,129M, y 3 mL en tubos de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Las muestras recogidas en citrato se utilizaron para realizar los estudios funcionales tales como la activación plaquetaria, test de generación de trombina (TGT), análisis de micropartículas (MPs), zimografía y unión de Anexina V.

Las muestras en EDTA sirvieron para determinar los niveles plasmáticos de TPO y APRIL.

El PRP fue obtenido mediante la centrifugación de sangre total a 150 x g, durante 20 minutos a 23°C.

El PPP se obtuvo mediante centrifugación de la sangre total a 2.500 x g, durante 20 minutos a 23°C.

El plasma libre de plaquetas (PFP) se obtuvo sometiendo al PPP a una segunda centrifugación a 13.000 x g durante 2 minutos a 23°C.

Para la obtención de plaquetas lavadas, los dos primeros tercios del PRP fueron centrifugados a 650 x g, durante 10 minutos a 23°C después de la adición de una solución de ácido cítrico/dextrosa (citrato de sodio 85 mM, ácido cítrico 65 mM y glucosa 104 mM) en una proporción ACD 1:10. A continuación el sedimento fue resuspendido en un volumen igual de solución tampón HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 145 mM, KCl 5 mM y MgSO<sub>4</sub> 1 mM; pH 7,4).

#### **4.4. Análisis de las muestras**

##### **4.4.1. Recuento de plaquetas**

Se determinó con el Coulter Ac. T Diff cell counter (*Beckman Coulter, Madrid, Spain*).

##### **4.4.2. Determinación de los niveles de TPO en plasma**

Se extrajo sangre en tubos de EDTA y se centrifugó a 1.500 x g durante 15 min a 23°C para obtener PPP, el cual fue centrifugado de nuevo a 10.000 x g durante 15 min a temperatura ambiente. El plasma sobrenadante fue conservado a -70°C hasta su análisis. Los niveles plasmáticos de TPO se determinaron mediante la técnica de ELISA, (*DuoSet-R&D, Minneapolis, MN, USA*).

#### **4.4.3. Determinación de plaquetas inmaduras o reticuladas**

La determinación de plaquetas reticuladas se realizó con la técnica previamente descrita por Hayashi et al [86]. Se cuantificaron por citometría de flujo marcando las plaquetas primero con 5  $\mu$ L de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad  $\alpha$ IIb unido a ficoeritrina (*Biocytex, Marseille, France*) y posteriormente con Retic-COUNT (*Thiazole orange; BD Biosciences, San Jose, CA, USA*). Las muestras se analizaron con el citómetro FACScan (*BD Biosciences*).

#### **4.4.4. Determinación de los niveles plasmáticos de APRIL**

Se determinaron los niveles de APRIL en PPP mediante la técnica de ELISA (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*).

#### **4.4.5. Estudio de la activación plaquetaria**

La activación de las plaquetas se evaluó a través del análisis de la activación del receptor de fibrinógeno (Fg) y por la expresión de P-selectina (marcador de activación plaquetaria y de liberación de gránulos intraplaquetarios) en la superficie de las plaquetas [87].

Para determinar el estado de activación plaquetario se utilizó el PRP. El estado de activación de las plaquetas se estudió en estado basal y después de un estímulo con diferentes agonistas.

Para evaluar el receptor del Fg activado, el PRP se diluyó 1:5 con tampón HEPES y alícuotas de 50  $\mu$ L se incubaron con buffer (condición basal) o con TRAP 100  $\mu$ M (*Péptido Activador del Receptor de Trombina, SFLLRN, Bachem, Bubendorf, Suiza*)

durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se añadió PAC1 (*Becton Dickinson, Madrid, Spain*), un anticuerpo monoclonal (mAb) que reconoce sólo la forma activa del receptor de fibrinógeno, marcado con fluoresceína (FITC). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, las plaquetas se diluyeron con tampón fosfato salino (PBS) y se realizó el análisis por citometría de flujo (*Becton Dickinson FACScan benchtop flow cytometer, Becton Dickinson*).

Para determinar el número de receptores de Fg existentes en la superficie plaquetaria, el PRP se diluyó a 1:5 en buffer PBS y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal unido a ficoeritrina (PE), dirigido contra la subunidad  $\alpha$ IIb (*CD41, Biocytex, Marseille, France*) o contra la subunidad  $\beta$ 3 del receptor de Fg (*BD Pharmingen*). Tras la incubación el PRP se diluyó de nuevo con PBS (1:6) y se analizaron por citometría de flujo.

La expresión de P-selectina se determinó evaluando la unión de un anticuerpo monoclonal anti-P-selectina marcado también con FITC (*BD Pharmingen, San Diego, CA, USA*) que se une a la P-selectina, marcador de degranulación. Se determinó tanto en estado basal como tras la estimulación con TRAP 100  $\mu$ M. La incubación con los anticuerpos se realizó durante 15 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.

#### **4.4.6. Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas.**

La expresión de PS se midió mediante su unión a Anexina V marcada con FITC (*BD Pharmingen*). Las plaquetas lavadas se suspendieron nuevamente en buffer para la unión de Anexina V (10 mM Hepes, 10 mM NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH

7.4) incubándolas posteriormente con Annexin V-FITC durante 15 minutos en la oscuridad. Posteriormente las muestras analizaron por citometría de flujo.

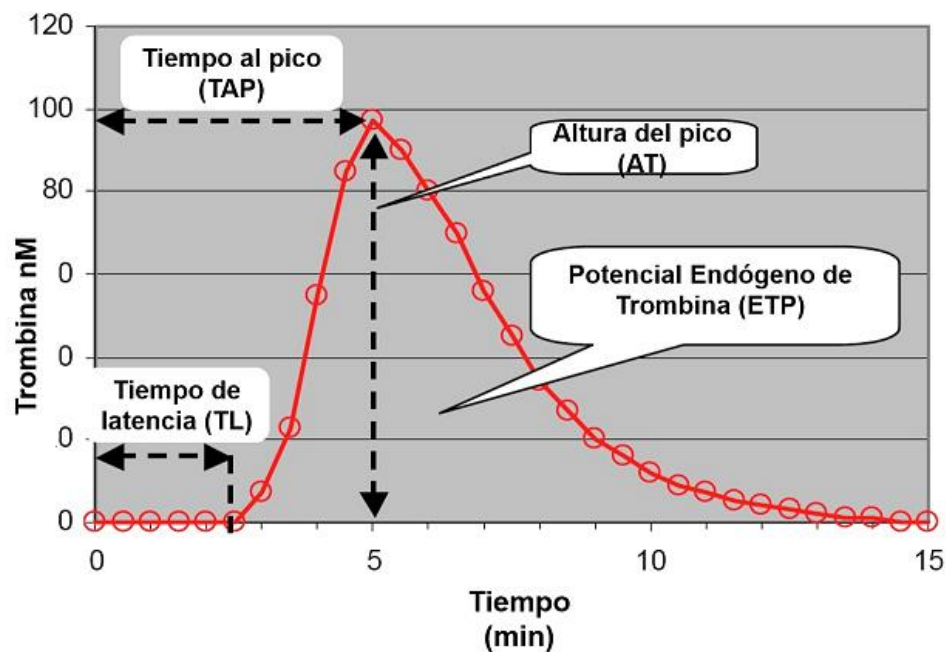
#### **4.4.7. Estudio de la capacidad procoagulante del plasma**

La trombina es la molécula clave del mecanismo hemostático, por lo que evaluar su generación es una prueba de la capacidad hemostática de la sangre. Para medir la generación de trombina se utilizó la trombinografía calibrada automatizada (CAT, *Calibrated Automated Thrombogram, Thrombinoscope*). El CAT es un método fluorimétrico que cuantifica la cantidad de trombina que se genera en una muestra de plasma después de la activación de la coagulación.

En este ensayo se añade al plasma a estudio un sustrato fluorogénico específico de la trombina que al ser escindido por ella libera un producto fluorescente. El desarrollo de la fluorescencia en función del tiempo permitirá conocer la cinética de la generación de trombina [88].

Por lo general, la activación de la coagulación se realiza con FT y una mezcla de PLs si la muestra es plasma pobre en plaquetas (PPP) o con FT sin PLs en el caso de utilizar plasma rico en plaquetas (PRP). La medición se realiza en un fluorímetro de placa de 96 pocillos equipado con un filtro de excitación/emisión (390/640) a una temperatura de 37°C. El equipo cuenta con un programa específico que permite su manejo y el cálculo automático de la generación de trombina. Una de las ventajas más importantes del método fluorimétrico es que no se afecta por la turbidez de la muestra. Sin embargo, el test se puede afectar por numerosos factores tales como el efecto del filtro interno (absorción y emisión de fluorescencia por las propias moléculas que la emiten), el

tiempo de uso de la lámpara emisora de la radiación excitante y la capacidad fluorogénica individual del plasma del paciente. También durante el transcurso de la determinación, un 30-40% del sustrato fluorogénico es consumido lo que afecta el cálculo de la concentración de trombina. Para corregir estos factores que pueden afectar la determinación de la producción de trombina el método incluye la medición en paralelo de la generación de trombina en pocillos que contienen la muestra problema y una concentración conocida del complejo alfa2-macroglobulina/trombina. Este complejo puede escindir el sustrato fluorogénico pero no es capaz de actuar sobre ninguno de los sustratos de la trombina.



**Figura 14. Trombograma con sus parámetros característicos.** En la figura se muestran los datos más importantes en la evaluación de un test de generación de trombina.

Los parámetros más importantes del test de generación de trombina son:

- El tiempo de latencia (TL) es el tiempo requerido para la formación de 10 nM de trombina.
- El tiempo al pico (TAP) es el tiempo requerido para alcanzar la máxima concentración de trombina o la altura del pico (AP).
- El potencial endógeno de trombina (ETP) representa la capacidad máxima de generación de trombina de la muestra y es equivalente al área bajo la curva de la concentración de trombina vs. el tiempo.

Todos los parámetros son calculados de forma automática por el programa *Thrombinoscope de Thrombinoscope BV (Maastricht, Holanda)*. El Índice de Velocidad (IV), permite calcular la velocidad con la que se genera la trombina durante el ensayo. Se puede obtener a partir de los datos experimentales mediante la siguiente fórmula:

$$IV = AP / TAP - LT$$

En nuestros pacientes la capacidad de generación de trombina fue medida en alícuotas de 80  $\mu$ L de PFP, se añadió 20  $\mu$ L del reactivo PPP reagent-LOW, (*Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands*), compuesto por FT recombinante (concentración final de 1 pM) y una mezcla de PLs (concentración final de PLs totales de 4  $\mu$ M), y 20  $\mu$ L de una solución tampón compuesta por un sustrato específico de la trombina y  $\text{CaCl}_2$  (solución FluCa Kit de *Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands*). La generación de trombina se registró de forma continua con un fluorímetro Fluoroscán FL (*Thermo Labsystems, Helsinki, Finland*), (excitación a 390 nm y emisión a 460 nm). Los valores de fluorescencia se convirtieron en actividad de trombina en función del tiempo con el

programa específico Thrombinoscope (*Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands*), versión 3.6. Todas las muestras se hicieron por triplicado.

Con el CAT se evaluaron cuatro parámetros de la generación de trombina: ETP, LT (tiempo que transcurre hasta que comienza la generación de trombina), TTP y la AT.

#### **4.4.8. Estudio de la capacidad procoagulante del plasma asociada a Micropartículas (MPs)**

Se extrajo sangre total utilizando citrato como anticoagulante, se centrifugó a 1.500 x g durante 15 minutos a 23°C, el PPP obtenido se centrifugó dos veces más a temperatura ambiente (15 min a 1.500 x g, y 2 min a 13.000 x g). El plasma libre de plaquetas (PFP) se almacenó en alícuotas a -70°C hasta que se analizó.

La actividad procoagulante se determinó mediante el ZYMUPHEN MP-Activity kit (*Hyphen BioMed, Neuville sur Oise, France*), siguiendo sus instrucciones de uso.

ZYMUPHEN MP-Activity kit es un test funcional para medir la actividad procoagulante de las MPs en plasma humano (a través de la generación de trombina). Se puede utilizar un método automatizado o manual [89, 90].

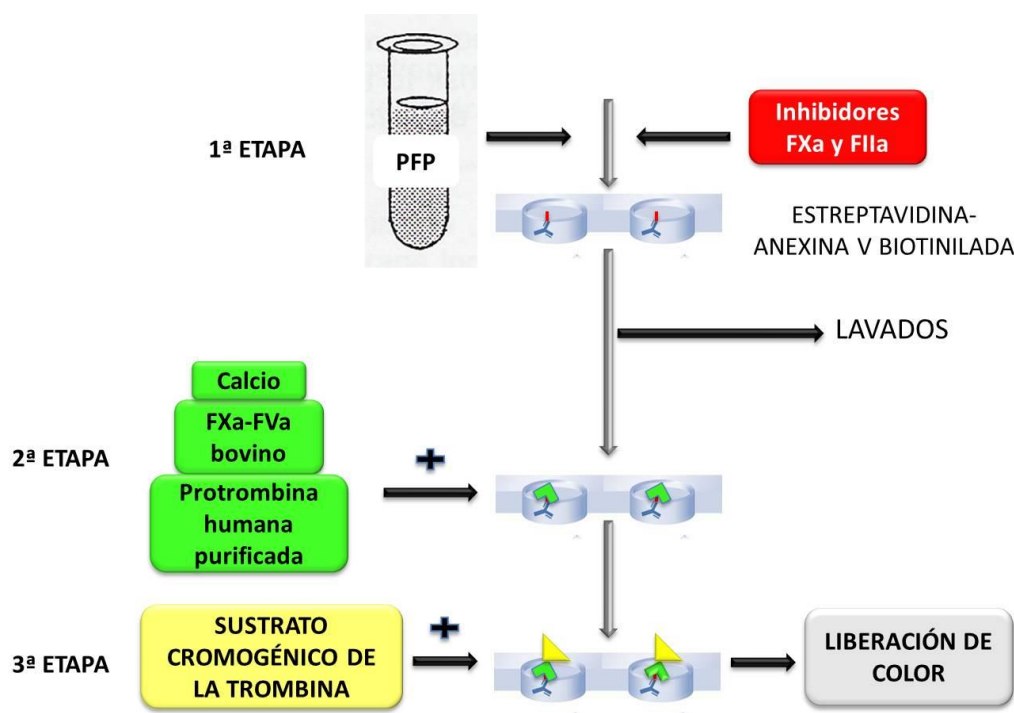
Al PFP se le añade calcio, FXa e inhibidores de la trombina, y se introduce en un pocillo de una microplaca recubierto con estreptavidina y Anexina unida a biotina.

Posteriormente se añade protrombina purificada a la mezcla de PPP, FXa-FVa y calcio. Por otra parte, las MPs presentes en la muestra a estudiar, se unen a la Anexina-V y exponen PLs en su superficie, las cuales permitirán el paso de protrombina a trombina. La cantidad de trombina generada será proporcional a la cantidad de PLs contenidos



en la muestra. La concentración de PLs es el factor limitante de la reacción, la cual, a su vez, es directamente proporcional a las MPs contenidas en el plasma a estudio.

La trombina generada se une a un sustrato cromogénico, la reacción se para con ácido cítrico al 2% y posteriormente, se mide la absorbancia o liberación de color a 405 nm (A405).



**Figura 15. Esquema de ZYMUPHEN MP-Activity kit.** En la figura podemos ver las diferentes fases del test, en el podemos ver que la trombina generada se une a un sustrato cromogénico liberando color.

#### 4.4.9. Caracterización del origen celular de las micropartículas

La cuantificación y determinación del origen de las MPs se realizó en PFP por citometría de flujo siguiendo las recomendaciones de los "Scientific Subcommittees of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on

*Thrombosis and Haemostasis*". Para detectar las MPs fue necesario calibrar el citómetro con microesferas que permitieron establecer la ventana que incluía a las partículas de <1 micra de diámetro. Las MPs se identificaron según su tamaño y su capacidad para unir FITC-Anexina V. Por otra parte, para identificar el origen celular y la composición de las mismas, se usaron anticuerpos monoclonales contra los antígenos específicos de distintos tipos celulares: plaquetas (*CD41, Biocytex, Marseille, France*), eritrocitos (*CD235*), monocitos (*CD14*), células endoteliales (*CD31*) y leucocitos (*CD45*) marcados con PE (*BD Biosciences, Madrid, Spain*).

#### **4.4.10. Análisis estadístico**

Los resultados se expresarán como media  $\pm$  desviación estándar. Los datos se analizaron utilizando ANOVA y test post-hoc de Dunn, o test de Student o test de Mann-Whitney, o test de Wilcoxon, y las correlaciones se hallarán con el test de Pearson o de Spearman según la distribución de la población sea normal o no. Los valores de  $P < 0,05$  se consideraron significativos. El análisis se realizó con el software SPSS versión 17.0 para Windows (*SPSS, Chicago, IL, USA*).

## **5. RESULTADOS**



## 5.1. Características de los pacientes

### 5.1.1. Pacientes con trombocitopenia central.

En las siguientes tablas podemos ver las características de los pacientes con SMD y las de los pacientes con postquimioterapia.

**Tabla 5. Características de los pacientes con TPC secundaria a SMD.**

	Edad (años)	Diagnóstico OMS, IPSS	Cifra de plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	Soporte transfusional y tratamientos previos
1.	80	AREB-1, IPSS Int-1	27	Sí (CH y Plaq) Azacitidina
2.	81	CRDM, IPSS Int-1	77	Ninguno
3.	69	SMD inclasificable, IPSS Int-1	68	Sí (CH y Plaq)
4.	82	AREB-1, IPSS Int-1	55	EPO
5.	66	CRDM, IPSS Int-1	30	Sí (CH y Plaq)
6.	68	ARS, IPSS Bajo	35	Ninguno
7.	72	CRDM, IPSS Int-1	39	Ninguno
8.	59	CRDU, IPSS Bajo	22	Ninguno
9.	86	CRDU, IPSS Bajo	78	Ninguno
10.	85	AREB-2, IPSS Int-2	56	Sí (CH y Plaq)
11.	86	AREB-2, IPSS Int-2	24	Sí (CH y Plaq)
12.	87	CRDU, IPSS Int-1	68	EPO, PRD, Acfol
13.	76	AREB-2, IPSS Int-2	76	Sí (Plaq)
14.	72	CRDM, IPSS Int-1	34	Sí (CH y Plaq)
15.	78	CRDM, IPSS Int-1	79	Sí (Plaq)
16.	59	CRDU, IPSS Int-1	20	Ninguno
17.	79	SMD inclasificable, IPSS Int-2	8	Sí (CH y Plaq) EPO
18.	83	CRDM, IPSS Int-1	16	Sí (Plaq)

AREB: anemia refractaria con exceso de blastos; IPSS: índice Pronóstico Internacional; Int: Intermedio; CRDM: citopenia refractaria con displasia multilineal; ARS: anemia refractaria con sideroblastos; CRDU: citopenia refractaria con displasia unilineal; CH: Concentrado de hematíes; Plaq: plaquetas; EPO: eritropoyetina; PRD: prednisona.

**Tabla 6. Características de los pacientes con TPC postquimioterapia.**

	Edad (años)	Diagnóstico	Cifra de plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	Tratamiento
1.	65	MM IgA Kappa refractario	35	Bortezomib, DXM EPO
2.	39	LNH T periférico, EIIIB IPI Int-alto	50	Mega-CHOP
3.	52	Linfoma de Hodgkin EIVA, recaída	37	EHAP
4.	83	MM IgA Kappa EIIA	57	Talidomida
5.	20	LDCG B EIVB, IPI Int-alto	51	R-CHOP-14
6.	58	MM IgG kappa EIIIA	92	Bortezomib, DXM
7.	47	LAL pro-B	54	VCR, PRD y L- Asparaginasa
8.	61	LAM. TPH alogénico	21	Fludarabina, Busulfan
9.	67	MM, IgG Kappa, EII. TPH autólogo	42	Melfalán
10.	78	LDCG B EIVA con infiltración extranodal. IPI Int-alto	24	Metotrexate
11.	28	LNH T linfoblástico	36	HyperCVAD
12.	77	Linfoma del manto EIV, IPI Int-alto	38	Rituximab, Bendamustina
13.	77	LAM monoblástica/monocítica	25	Hidroxiurea
14.	78	LDCG B EIIA, IPI Int-alto	184	R-CHOP
15.	43	LNH T/NK nasal, IPI Int-alto	72	Hyper-CVAD
16.	69	LDCG B de senos paranasales IPI Int-bajo	45	R-GEMOX
17.	21	Linfoma de Hodgkin	32	ABVD

MM: Mieloma múltiple; LNH: Linfoma no Hodgkin; E: Estadio (Durie-Salmon); IPI: Índice Pronóstico Internacional; LDCGB: Linfoma no Hodgkin difuso de células grandes B; Int: Intermedio; LAL: Leucemia aguda linfoblástica; LAM: Leucemia aguda mieloblástica; TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos; NK: Natural killer; DXM: Dexametasona; EPO: Eritropoyetina; EHAP: VP-16, Cisplatino, Metilprednisolona, Citarabina; R-CHOP: Rituximab, Ciclofosfamida, Adriamicina, Vincristina, Prednisona; VCR: Vincristina; PRD: Prednisona; HyperCVAD: Ciclofosfamida, Vincristina, Doxorrubicina y Dexametasona; R-GEMOX: Rituximab, Gemcitabina y Oxilaplatino; ABVD: Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbacina.

### 5.1.2. Pacientes con trombocitopenia periférica

**Tabla 7. Características de los pacientes con PTI.**

	Edad (años)	Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	Tratamiento en los 2 últimos meses	Tratamientos previos
1.	77	17	Sí	PRD, IGIV, Rituximab
2.	67	184	No	PRD, IGIV, Esplenectomía
3.	74	59	No	IGIV
4.	76	33	No	IGIV
5.	18	56	Sí	PRD, IGIV
6.	79	89	No	IGIV, Esplenectomía
7.	59	109	No	PRD
8.	37	1	Sí	PRD, IGIV, Esplenectomía
9.	81	21	Sí	PRD, IGIV, Azatioprina
10.	58	42	Sí	PRD, IGIV
11.	80	34	Sí	PRD, IGIV, Romiplostim
12.	41	35	Sí	PRD
13.	40	243	No	PRD, IGIV, Esplenectomía
14.	48	121	Sí	PRD
15.	82	145	Sí	PRD, IGIV
16.	35	149	No	Ninguno
17.	61	49	No	Ninguno
18.	52	34	No	Ninguno
19.	26	50	Sí	PRD, IGIV
20.	23	41	No	IGIV
21.	25	48	No	Ninguno
22.	83	41	Sí	PRD, IGIV
23.	67	47	No	PRD, IGIV
24.	44	89	No	Ninguno
25.	64	136	No	PRD, IGIV, Esplenectomía
26.	85	68	No	PRD
27.	86	94	Sí	PRD
28.	40	146	No	PRD, Azatioprina

	Edad (años)	Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	Tratamiento en los 2 últimos meses	Tratamientos previos
29.	92	20	No	PRD, IGIV
30.	40	55	Sí	PRD
31.	54	7	No	PRD, IGIV, esplenectomía
32.	52	1	Sí	PRD, IGIV
33.	38	1	Sí	PRD, IGIV, Esplenectomía, Eltrombopag
34.	83	28	Sí	IGIV
35.	42	46	No	PRD, IGIV
36.	65	48	Sí	PRD
37.	65	59	No	PRD, IGIV
38.	35	54	No	PRD, IGIV, Rituximab
39.	56	16	Sí	PRD, IGIV
40.	27	60	No	PRD, IGIV
41.	51	15	Sí	PRD,IGIV
42.	49	95	No	Ninguno
43.	77	30	No	PRD, IGIV
44.	26	53	Sí	Ninguno
45.	52	36	Sí	PRD, IGIV, Azatioprina
46.	80	123	Sí	PRD, IGIV
47.	46	317	No	PRD, Esplenectomía
48.	43	34	Sí	PRD, IGIV
49.	84	31	No	Ninguno
50.	65	82	No	PRD
51.	23	28	No	PRD
52.	33	42	Sí	PRD, IGIV, Esplenectomía
53.	70	18	Sí	PRD, IGIV, Dapsona, Esplenectomía
54.	73	17	Sí	PRD, IGIV, Rituximab, Romiplostim
55.	49	54	No	Ninguno
56.	46	33	No	PRD, IGIV
57.	81	1	Sí	PRD, IGIV
58.	21	51	No	PRD, IGIV,
59.	36	107	No	PRD, IGIV
60.	35	66	No	PRD, IGIV
61.	63	23	Sí	PRD, IGIV
62.	79	45	Sí	PRD,IGIV

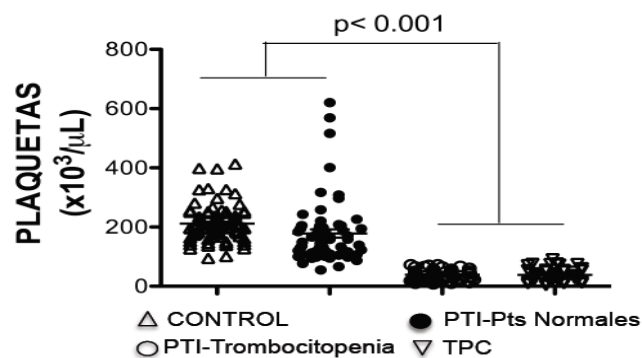


	Edad (años)	Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	Tratamiento en los 2 últimos meses	Tratamientos previos
63.	25	50	No	PRD, IGIV, Rituximab
64.	42	33	No	Ninguno
65.	76	37	No	Ninguno
66.	57	194	Sí	PRD, IGIV
67.	52	308	Sí	PRD, IGIV, Esplenectomía
68.	75	35	Sí	Ninguno
69.	76	167	No	PRD
70.	39	3	No	PRD, IGIV, Rituximab
71.	32	27	No	PRD, IGIV
72.	75	3	No	IGIV
73.	46	20	No	PRD, IGIV
74.	24	33	No	PRD, IGIV
75.	41	205	No	PRD, IGIV, Azatioprina
76.	39	32	No	PRD, IGIV
77.	69	43	No	Ninguno
78.	62	170	No	PRD, IGIV
79.	74	166	Sí	PRD, IGIV
80.	69	32	No	Ninguno
81.	84	40	Sí	Ninguno
82.	40	130	No	Ninguno
83.	35	132	Sí	Ninguno

PRD: Prednisona; IGIV: Inmunoglobulinas intravenosas

## 5.2. Recuento de plaquetas en los distintos grupos experimentales

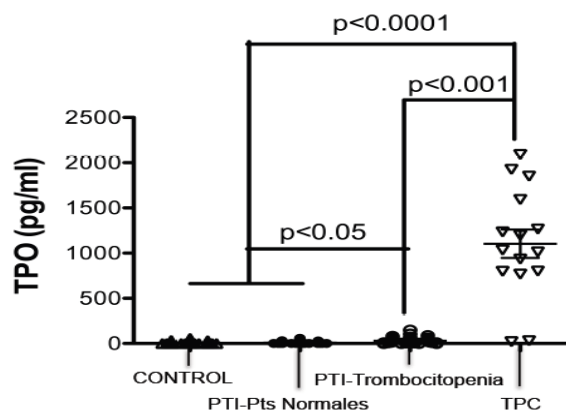
La figura 16 muestra que el número de plaquetas en los grupos de pacientes con PTI y trombocitopenia y de pacientes con trombocitopenia central (TPC) son comparables entre sí y difieren de forma significativa con el número de plaquetas del grupo control y del grupo de pacientes con PTI con número normal de plaquetas (PTI-Pts normales). Por este motivo decidimos utilizar estas poblaciones para realizar el estudio comparativo de las trombocitopenias periférica y central.



**Figura 16. Recuento de plaquetas en los diferentes grupos en estudio.** Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizadas por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

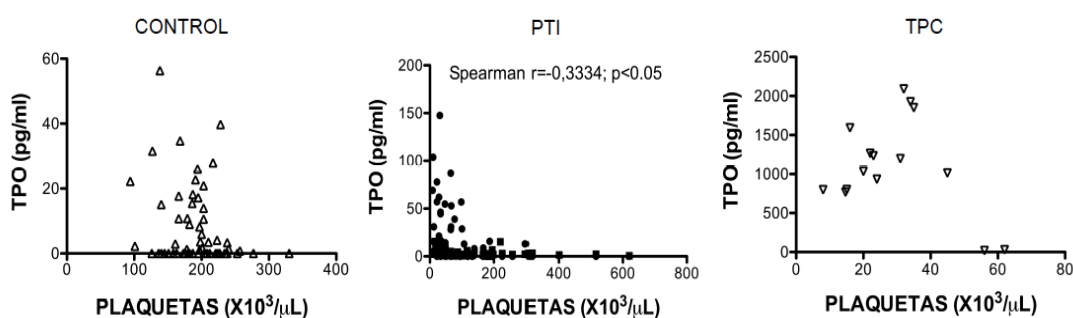
### 5.3. Estudio de la regulación del número de plaquetas por trombopoyetina en pacientes con PTI y en pacientes con TPC.

Con el objeto de evaluar la funcionalidad del mecanismo de regulación de la formación de plaquetas por trombopoyetina (TPO) se midieron los niveles plasmáticos de esta hormona en todos los grupos en estudio. Los individuos con un número normal de plaquetas (grupos control y PTI-Pts normales) presentaron niveles prácticamente indetectables de TPO. Todos los pacientes con trombocitopenia tenían una concentración circulante de TPO significativamente alta y este aumento era más pronunciado en aquellos pacientes con trombocitopenia de origen central (Figura 17).



**Figura 17. Niveles plasmáticos de TPO determinados por ELISA.** Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizadas por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

Analizamos si existía alguna correlación entre los niveles de TPO y el número de plaquetas y observamos una correlación negativa entre los niveles de TPO y el número de plaquetas en los pacientes con PTI pero no en los de TPC a pesar de que, como mencionamos antes, estos últimos responden a la trombocitopenia produciendo mucha más TPO que los pacientes con PTI.

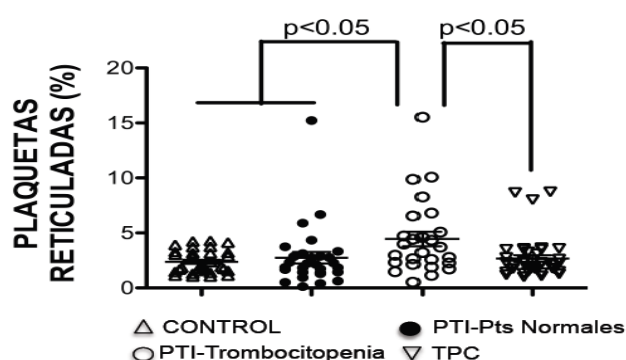


**Figura 18. Relación entre los niveles plasmáticos de TPO y el recuento plaquetario.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a los niveles de TPO y al número de plaquetas para cada individuo incluido en cada grupo en estudio. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) y de la variable estadística " $p$ " cuando esta es significativa ( $p<0,05$ ).

#### 5.4. Estudio de la producción de plaquetas inmaduras en pacientes con PTI y en pacientes con TPC

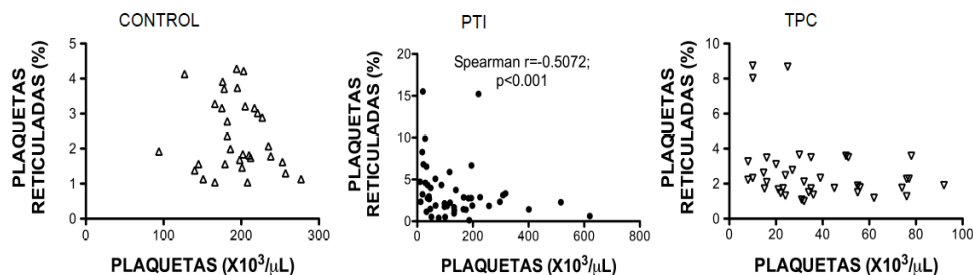
Estudiamos el porcentaje de plaquetas inmaduras o reticuladas en todos los grupos ya que este es un índice de la capacidad de producir plaquetas de la médula ósea (MO).

La figura 19 nos muestra que sólo los pacientes con PTI y trombocitopenia tenían aumentado el porcentaje de plaquetas reticuladas.

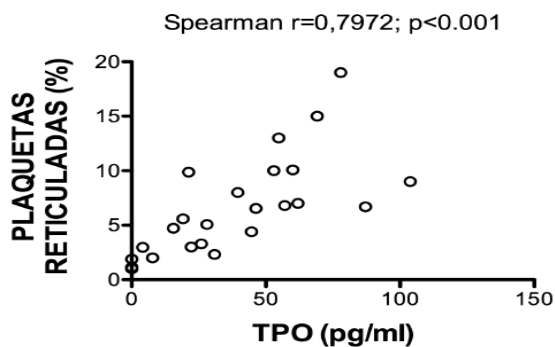


**Figura 19. Porcentaje de plaquetas reticuladas determinado por citometría de flujo.** Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizadas por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

En el grupo de pacientes con PTI el porcentaje de plaquetas reticuladas en circulación es mayor cuanto menor es el número de plaquetas (Figura 20). Este hecho parece estar relacionado con los niveles de TPO en plasma ya que existe una buena correlación entre el porcentaje de plaquetas reticuladas y los niveles plasmáticos de TPO (Figura 21).



**Figura 20. Relación entre el porcentaje de plaquetas reticuladas y el recuento plaquetario.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes al porcentaje de plaquetas reticuladas y al número de plaquetas para cada individuo incluido en cada grupo en estudio. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) y de la variable estadística “ $p$ ” cuando esta es significativa ( $p<0.05$ ).



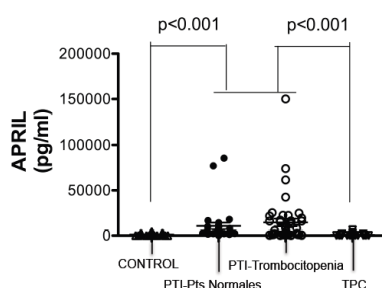
**Figura 21. Relación entre los niveles plasmáticos de TPO y el porcentaje de plaquetas reticuladas.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes al porcentaje de plaquetas reticuladas y la concentración plasmática de TPO para cada individuo. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) y de la variable estadística “ $p$ ” cuando esta es significativa ( $p<0.05$ ).

Estos resultados confirman el hecho de que la MO de los pacientes con PTI puede generar plaquetas y responder al estímulo de la TPO, mientras que las de los pacientes con TPC son aplásicas o presentan una importante disfunción (SMD) que les impide generar plaquetas a pesar del alto nivel de TPO que poseen en la circulación.

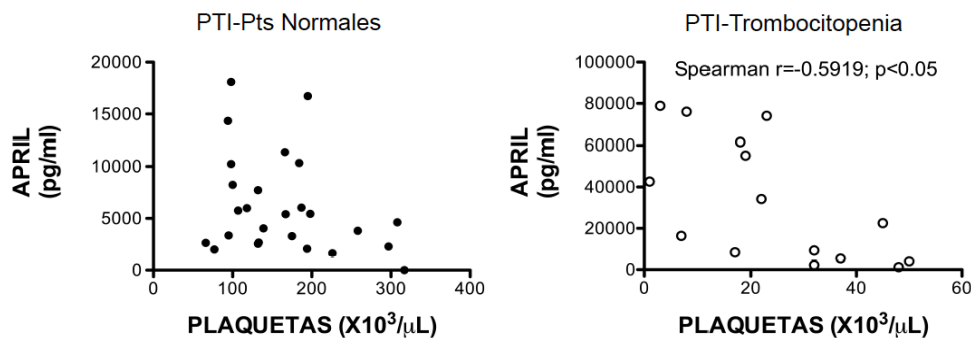
### 5.5. Estudio de los niveles plasmáticos de APRIL

Como se mencionó en la introducción, el APRIL es un factor involucrado en la estimulación de los linfocitos B y la producción de anticuerpos. Estudiamos los niveles de APRIL y su relación con el número de plaquetas en nuestras cohortes de pacientes con el objeto de establecer la existencia de características diferenciales entre ambas trombocitopenias que puedan reflejar la etiopatogenia de las mismas.

Todos los pacientes con PTI presentaron niveles elevados de APRIL en el plasma (Figura 22) que, en el caso de los pacientes con trombocitopenia, se correlacionaban de forma inversa con el número de plaquetas (Figura 23). Estos resultados apoyan el hecho de que la causa de la trombocitopenia en los pacientes con PTI es la destrucción de las plaquetas debido a la presencia de anticuerpos.



**Figura 22- Niveles plasmáticos de APRIL.** Se muestran los niveles plasmáticos de APRIL determinados por ELISA. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posterior de Dunn.

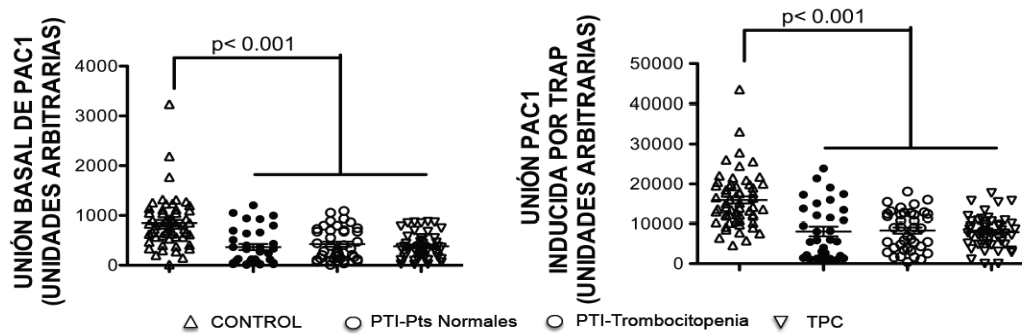


**Figura 23. Relación entre los niveles de APRIL y el recuento plaquetario en los pacientes con PTI.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la concentración plasmática de APRIL y el número de plaquetas para cada individuo en los grupos de los pacientes con PTI sin y con trombocitopenia. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) y de la variable estadística “ $p$ ” cuando esta es significativa ( $p<0.05$ ).

## 5.6. Estudio de la funcionalidad plaquetaria

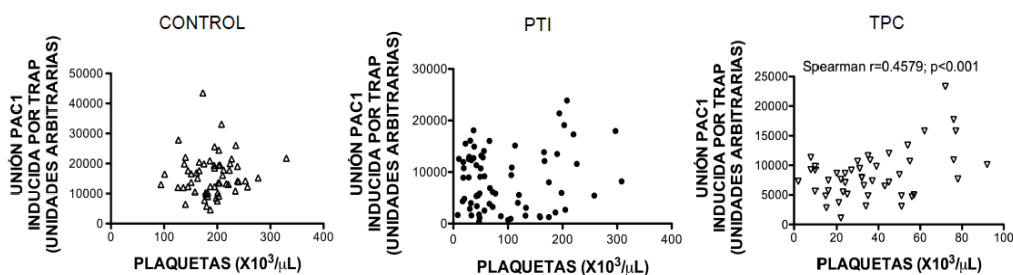
La capacidad de activación de las plaquetas por agonistas se determinó evaluando la habilidad del receptor de fibrinógeno de unir PAC1, anticuerpo que reconoce la conformación activa del receptor de fibrinógeno, y la exposición de P-selectina en la superficie de las plaquetas tras la activación con TRAP.

Las plaquetas de los pacientes con PTI y con TPC unieron menos PAC1 en estado basal y tras la activación con TRAP, indicando una menor capacidad de activación del receptor de fibrinógeno (Figura 24).



**Figura 24. Unión de PAC1 a la superficie de las plaquetas.** Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos en estudio se mantuvieron en condiciones basales (panel de la izquierda) o se estimularon con TRAP (100  $\mu$ M, panel de la derecha). La unión de PAC1 se determinó por citometría de flujo. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posterior de Dunn.

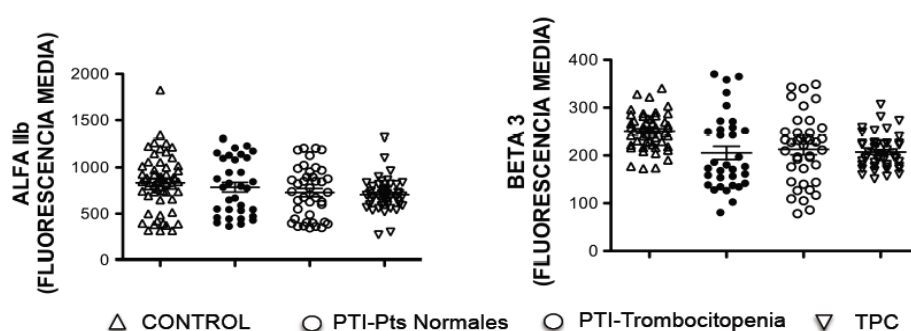
Estudiamos si existía alguna relación entre el número de plaquetas y la capacidad de activación del receptor de fibrinógeno y observamos una correlación negativa entre la capacidad de activación del receptor de fibrinógeno y el número de plaquetas en los pacientes con TPC, lo que indica que cuanto menos plaquetas tienen los pacientes peor es su función (Figura 25).



**Figura 25. Relación entre el recuento plaquetario y la función plaquetaria.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la unión de PAC1 y el número de plaquetas para cada individuo incluido en cada grupo en estudio. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) y de la variable estadística " $p$ " cuando esta es significativa ( $p<0.05$ ).

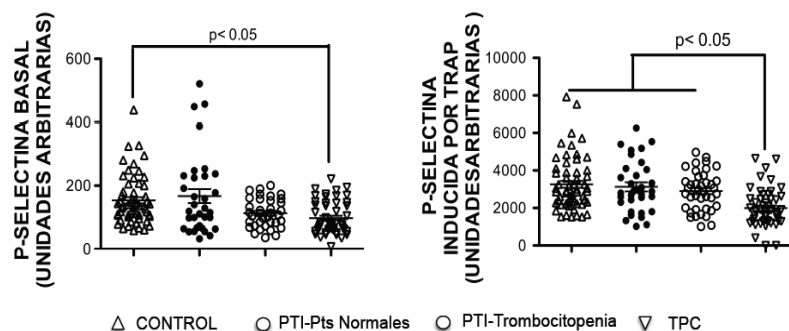


Una de las causas que podrían explicar la menor unión de PAC1 es que las plaquetas de los pacientes con PTI y con TPC presentaran menos receptores para el fibrinógeno. Por este motivo evaluamos la presencia de las subunidades alfa2b y beta3 que forman el receptor de fibrinógeno y observamos que la expresión de ambas subunidades en las plaquetas de los grupos de los pacientes no difería de la de las plaquetas del grupo control (Figura 26).



**Figura 26. Expresión del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas.** Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos en estudio se incubaron con anticuerpos específicos contra la subunidad alfaIIb (panel de la izquierda) o beta3 (panel de la derecha). La unión de los anticuerpos se determinó por citometría de flujo. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posterior de Dunn.

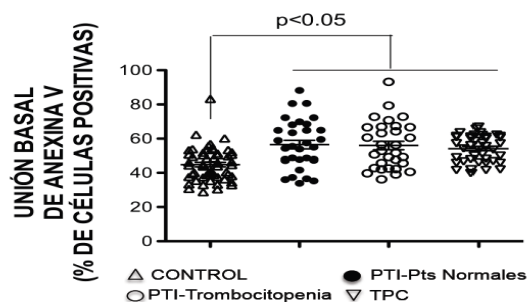
También evaluamos la exposición de P-selectina (marcador de activación plaquetaria y de liberación de gránulos intraplaquetarios) en condiciones basales y tras la estimulación con TRAP. En este caso vemos que sólo los pacientes con TPC expresaban menos P-selectina en su superficie (Figura 27)



**Figura 27. Expresión de P-selectina en la superficie de las plaquetas.** Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos en estudio se mantuvieron en condiciones basales (panel de la izquierda) o se estimularon con TRAP (100  $\mu$ M, panel de la derecha). La unión de un anticuerpo específico contra la P-selectina se evaluó por citometría de flujo. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posterior de Dunn.

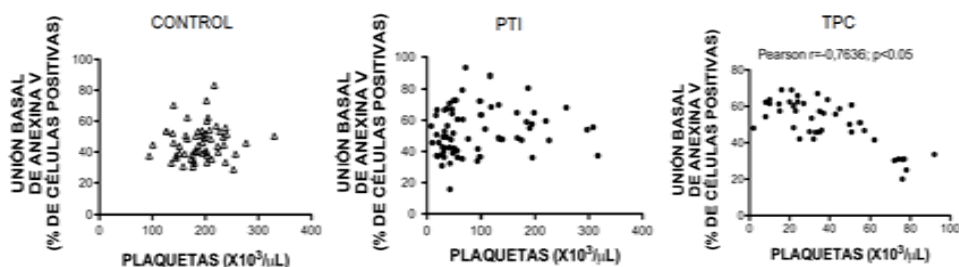
### 5.7. Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas

Las plaquetas pueden sufrir apoptosis y una de sus manifestaciones es la exposición de PS en su superficie. Como los pacientes con PTI y TPC presentaban una función plaquetaria anómala decidimos estudiar la exposición de PS en condiciones basales. Las plaquetas de los pacientes con PTI y con TPC exponían más PS en su superficie que las plaquetas de los controles (Figura 28).



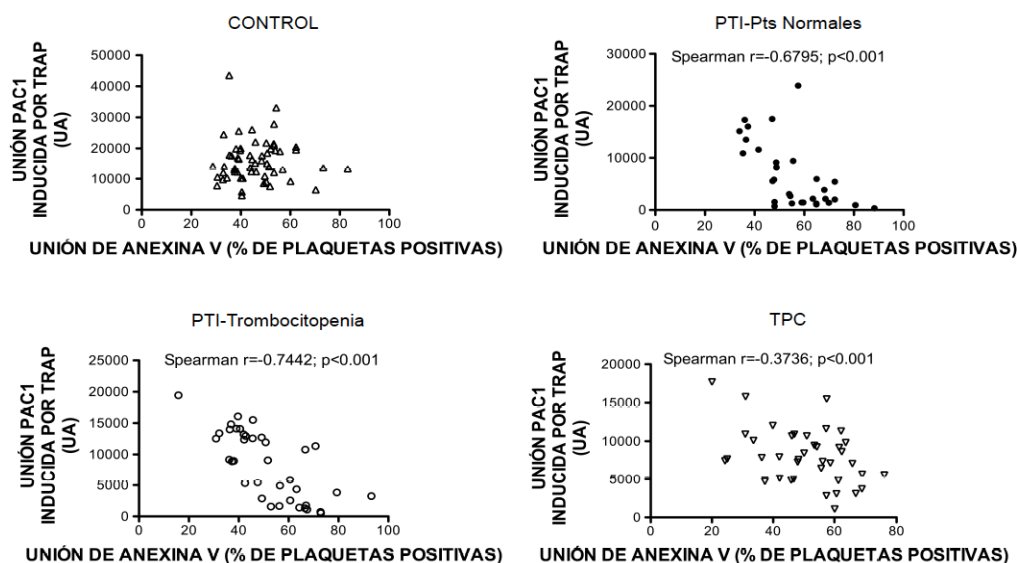
**Figura 28. Exposición de fosfatidilserina en la superficie de las plaquetas.** Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos se mantuvieron en condiciones basales, se incubaron con Anexina V marcada con fluoresceína y se analizaron por citometría de flujo. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posterior de Dunn.

El análisis de la relación entre el número de plaquetas y su grado de apoptosis mostró que cuanto menor era el número de plaquetas que tenían los pacientes con TPC, éstas exponían más fosfatidilserina en su superficie (Figura 29).



**Figura 29. Relación entre la unión de Anexina V a la superficie plaquetaria y el recuento plaquetario.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la unión de Anexina V y el número de plaquetas para cada individuo incluido en cada grupo en estudio. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) y de la variable estadística “ $p$ ” cuando esta es significativa ( $p<0.05$ ).

La disfunción en la capacidad de activación de las plaquetas de los pacientes con PTI y TPO podía relacionarse con el grado de apoptosis de las mismas ya que existe una buena correlación negativa entre la activación inducida por TRAP y la apoptosis en las plaquetas de los pacientes con PTI y TPC (Figura 30).

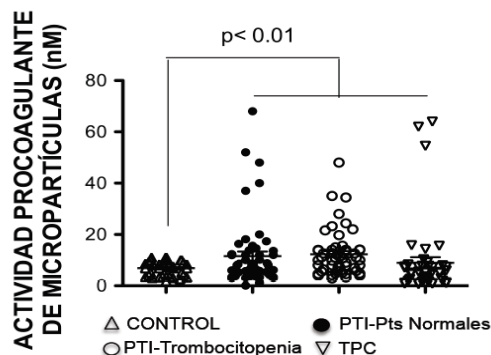


-

**Figura 30. Relación entre la unión de PAC1 y de Anexina V.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la unión de PAC1 y de Anexina V para cada individuo incluido en cada grupo en estudio. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) y de la variable estadística “ $p$ ” cuando esta es significativa ( $p<0.05$ ).

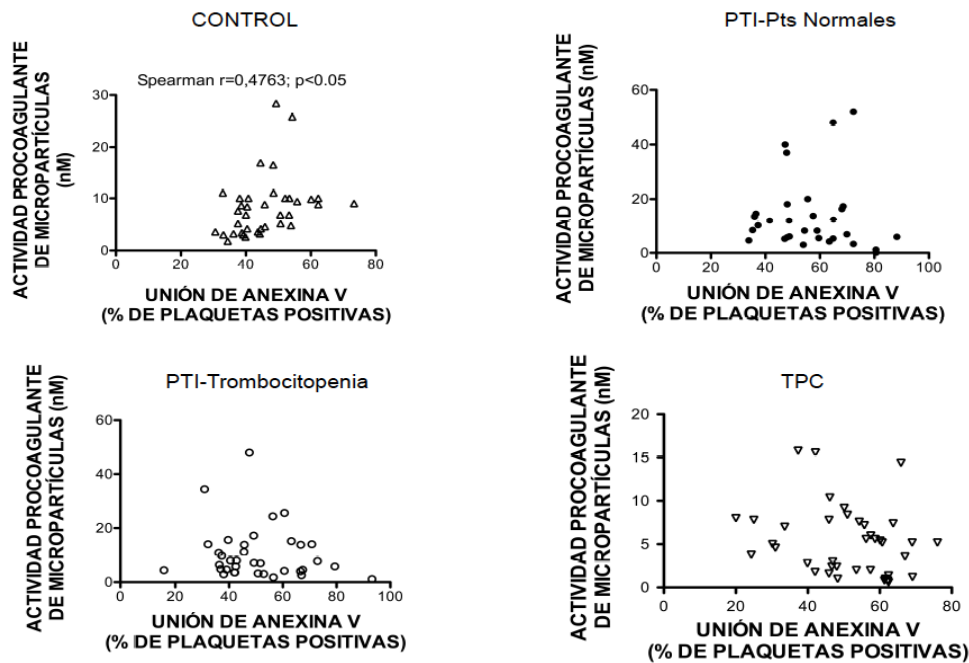
## 5.8. Estudio de la capacidad procoagulante asociada a micropartículas

Uno de los objetivos de este trabajo fue identificar las posibles causas que compensan la trombocitopenia y disminuyen el riesgo de sangrado en las PTI y en las TPC. Por este motivo estudiamos la capacidad procoagulante de las micropartículas circulantes en el plasma y observamos que esta es mayor en los grupos de los pacientes con PTI y con TPC que en el grupo control (Figura 31).



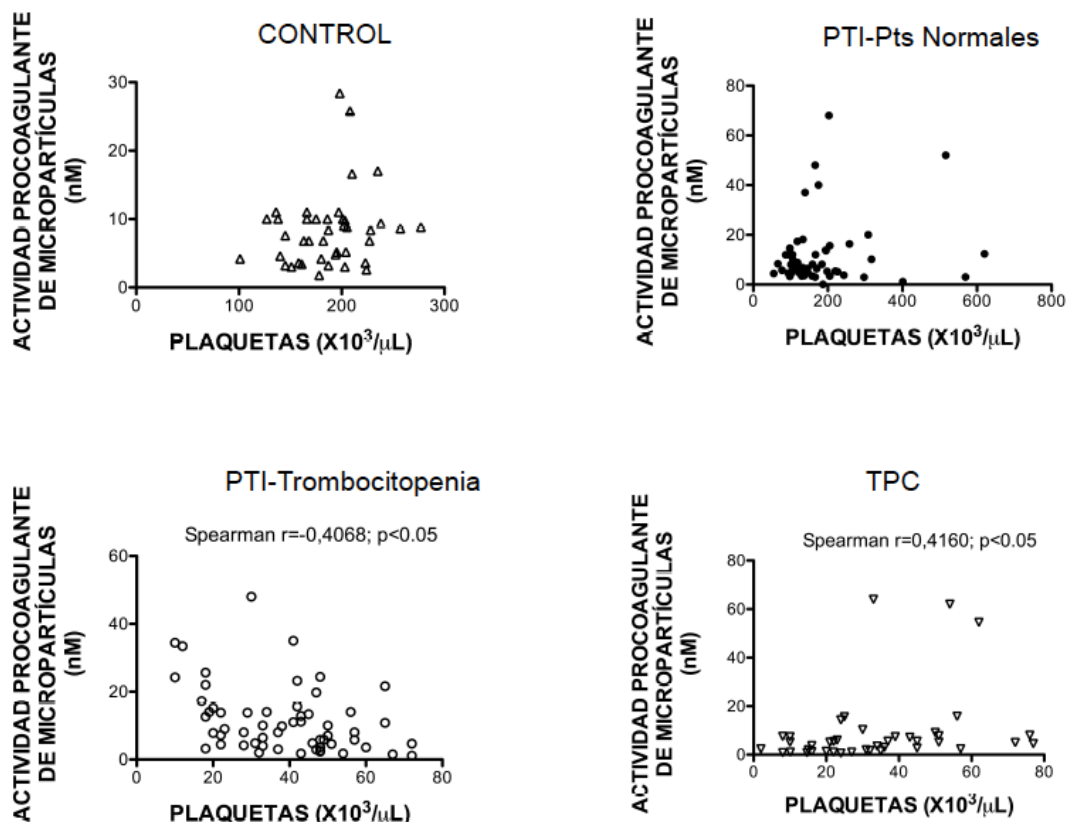
**Figura 31. Actividad procoagulante asociada a micropartículas.** El PFP preparado según se indica en “Métodos” se ensaya con el kit de Zymuphen que evalúa la fosfatidilserina de las micropartículas. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

Las micropartículas se liberan por activación o por apoptosis celular. Nuestros resultados mostraron que la activación de las plaquetas de los pacientes con PTI y con TPC era menor que en el grupo control, por lo que la activación no podía ser la causa de la generación de más micropartículas que en los controles sanos. Por el contrario, las plaquetas de los pacientes con PTI y con TPC presentaban más signos de apoptosis que el grupo control. Por este motivo analizamos si existía una relación entre la actividad procoagulante asociada a micropartículas y el grado de apoptosis plaquetaria y vimos que esta relación sólo existía en el grupo control (Figura 32).



**Figura 32. Relación entre la actividad procoagulante de las micropartículas y la unión plaquetaria de Anexina V.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la actividad procoagulante de las micropartículas y la unión de Anexina V para cada individuo incluido en cada grupo en estudio. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) y de la variable estadística “ $p$ ” cuando esta es significativa ( $p<0.05$ ).

Los pacientes con PTI y trombocitopenia poseían mayor capacidad procoagulante asociada a las micropartículas cuanto menor era el número de plaquetas (Figura 33).

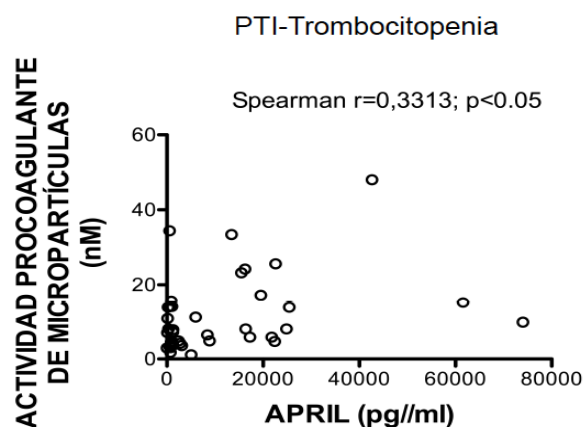


**Figura 33. Relación entre la actividad procoagulante de las micropartículas y el número de plaquetas.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la actividad procoagulante de las micropartículas y el número de plaquetas para cada individuo incluido en cada grupo en estudio. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) y de la variable estadística " $p$ " cuando esta es significativa ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados sugieren que en los pacientes con PTI y trombocitopenia la destrucción de las plaquetas (con la consecuente reducción en su número) provocaría un aumento en las micropartículas y con ello de la capacidad procoagulante asociada a ellas. Por el contrario, en los pacientes con TPC la correlación entre la capacidad procoagulante asociada a micropartículas aumentaban con el número de plaquetas,

hecho que sugiere que las micropartículas podían ser de un origen celular diferente de las plaquetas.

La destrucción de las plaquetas en los pacientes con PTI está asociada a la presencia de anticuerpos antiplaquetarios. Resultados mostrados anteriormente sugerían la existencia de una relación entre los niveles de APRIL, estimulante de la producción de anticuerpos, y el grado de trombocitopenia en pacientes con PTI. Este hecho nos llevó a analizar si existía alguna relación entre la capacidad procoagulante asociada a micropartículas y el APRIL y observamos que ambos parámetros se correlacionaban de forma significativa (Figura 34).

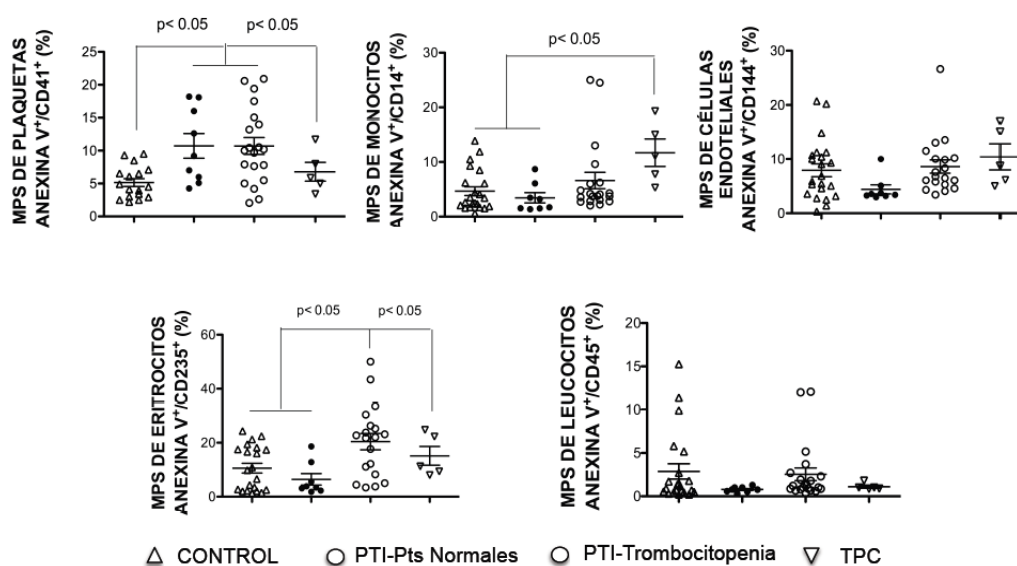


**Figura 34. Relación entre la actividad procoagulante de las micropartículas y la concentración plasmática de APRIL.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la actividad procoagulante de las micropartículas y la concentración plasmática de APRIL para cada individuo con PTI y trombocitopenia. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) y de la variable estadística “ $p$ ”



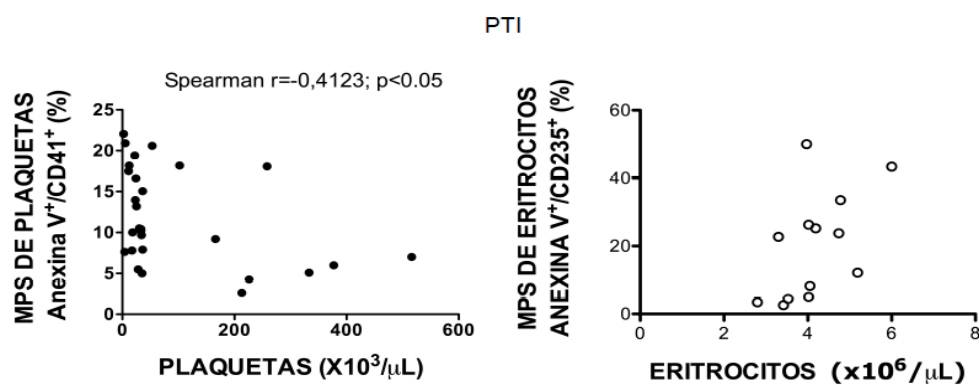
### 5.9. Caracterización del origen celular de las micropartículas en pacientes con PTI y en pacientes con TPC

La caracterización del origen celular de las micropartículas presentes en los diferentes grupos de pacientes mostró que todos los pacientes con PTI presentaban un aumento en el porcentaje de micropartículas de origen plaquetario. Aquellos pacientes con PTI y trombocitopenia también tenían incrementado el porcentaje de micropartículas de glóbulos rojos, mientras que los pacientes con TPC tenían aumentadas las micropartículas provenientes de los monocitos (Figura 35).



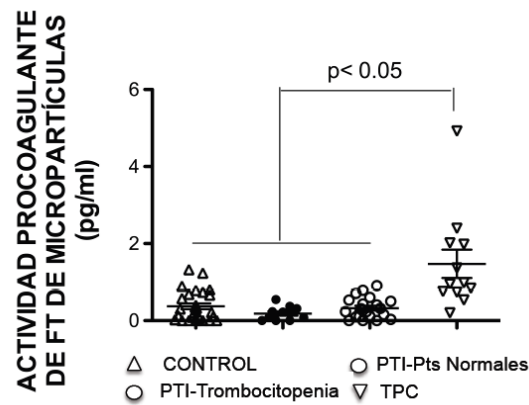
**Figura 35. Detección del origen celular de las micropartículas.** Alícuotas del PFP se incuban de forma conjunta con Anexina V marcada con fluoresceína y un anticuerpo específico para cada tipo celular marcados con ficoeritrina y se analizan por citometría de flujo según se indica en “Métodos”. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

En el grupo de pacientes con PTI analizamos si existía alguna relación entre el número de micropartículas de plaquetas y de glóbulos rojos con el número de las células de origen. Encontramos una correlación negativa entre el número de micropartículas de origen plaquetario y el número de plaquetas y ninguna relación entre las micropartículas de glóbulos rojos y el número de glóbulos rojos (Figura 36).



**Figura 36. Relación entre el porcentaje de micropartículas y el recuento celular.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a las micropartículas de origen plaquetario y el número de plaquetas (panel de la izquierda) y a las de origen eritrocitario y el número de eritrocitos para cada individuo con PTI estudiado. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) y de la variable estadística “ $p$ ” cuando esta es significativa ( $p<0.05$ ).

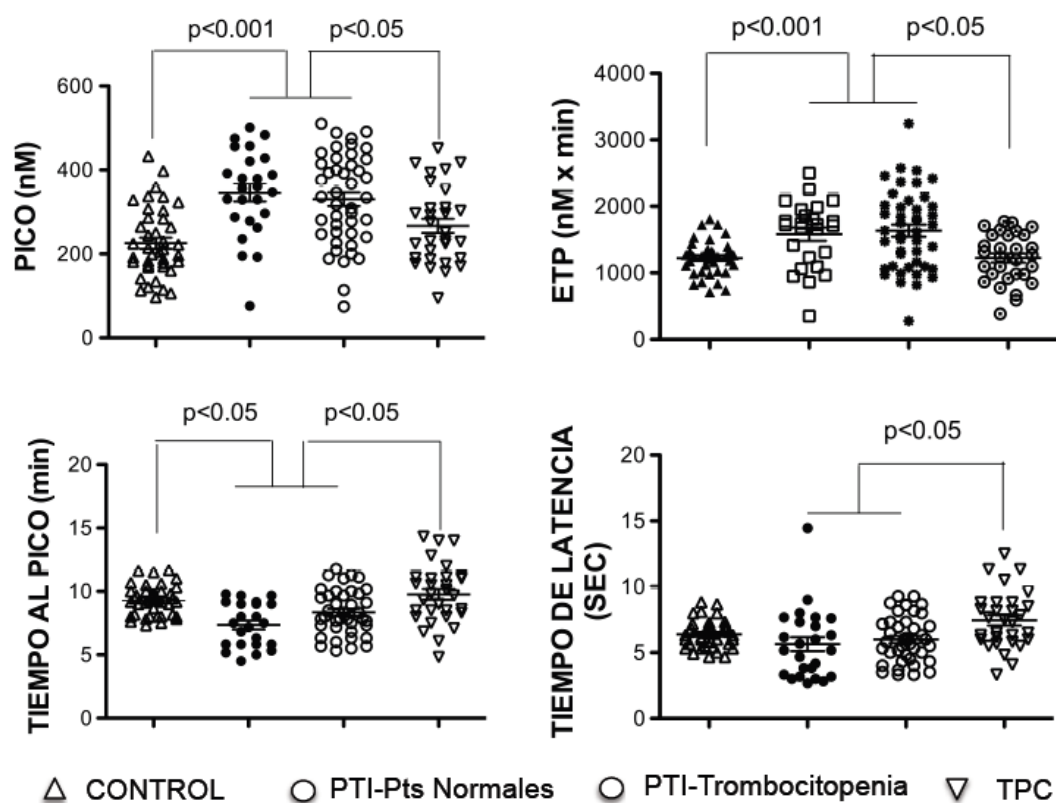
Tampoco encontramos correlación entre las micropartículas de monocitos y su número en pacientes con TCP (datos no mostrados). Por otra parte, dado que los monocitos son ricos en factor tisular (FT) y que las TPC muestran mayor número de micropartículas de este origen, evaluamos la actividad procoagulante de las micropartículas asociada a FT y vimos que las de los pacientes con TPC era mayor que la del resto de los grupos (Figura 37).



**Figura 37. Actividad procoagulante asociada al factor tisular (FT) de las micropartículas.** El PFP preparado según se indica en “Métodos” se ensaya con el kit de Zymuphen que evalúa el contenido de FT de las micropartículas. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

#### 5.10. Estudio de la capacidad procoagulante del plasma en pacientes con PTI y en pacientes con TPC

La capacidad procoagulante del plasma también puede ser un mecanismo compensatorio de la trombocitopenia. El plasma de los pacientes con PTI, con y sin trombocitopenia, presentan una mayor capacidad de generar trombina que los controles y que los pacientes con TPC (Figura 38).



**Figura 38. Test de generación de trombina.** Valores obtenidos en la Trombinografía Automática Calibrada (CAT) en los pacientes con PTI (sin y con trombocitopenia), con TPC y en controles sanos. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn.

El aumento de la capacidad procoagulante del plasma de los pacientes con PTI pudo deberse, al menos en parte, al aumento del FVII y del FXII de la coagulación observados en estos pacientes ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias en los niveles de FVIII, FIX, fibrinógeno y antitrombina III entre los pacientes con PTI y los de TPC (Tabla 8).

**Tabla 8. Niveles plasmáticos de factores involucrados en la coagulación.**

	PTI (n=10)	TPC (n=9)
FVII	132,0 ± 7,6	91,4 ± 10,9*
FVIII	191,7 ± 7,9	195,5 ± 7,0
FIX	121,2 ± 5,3	111,9 ± 8,3
FXII	113,7 ± 4,5	93,9 ± 4,3*
Fibrinógeno	246,0 ± 17,3	294,9 ± 16,0
Antitrombina III	102 ± 2,2	101 ± 5,0

Comparación entre grupos realizada por Mann Whitney. Se muestran la media ± DE.

\*Diferencias estadísticamente significativas.

### **5.11. Estudio del efecto del tratamiento con agentes estimulantes de la trombopoyesis sobre la hemostasia de pacientes con PTI.**

En años recientes se han comenzado a utilizar AR-TPO para el tratamiento de pacientes con PTI y trombocitopenia refractaria a los agentes de primera línea. Como existían pocos datos del efecto de estos tratamientos sobre la hemostasia en pacientes con PTI y trombocitopenia, decidimos proceder a su estudio.

#### **5.11.1. Características demográficas y datos clínicos de los pacientes incluidos en este estudio.**

Se incluyeron trece pacientes con PTI crónica (57% mujeres), de edad media de 59,7 años (rango 38-81) y 25 individuos sanos (55% mujeres), con una edad media de 47 años (rango 20-80). Dos pacientes tuvieron antecedentes de episodios trombóticos (uno, apoplejía isquémica aguda y el otro, enfermedad de la arteria coronaria con injerto de baipás aorto-coronario). La Tabla 2 muestra las características clínicas de los pacientes incluidos.

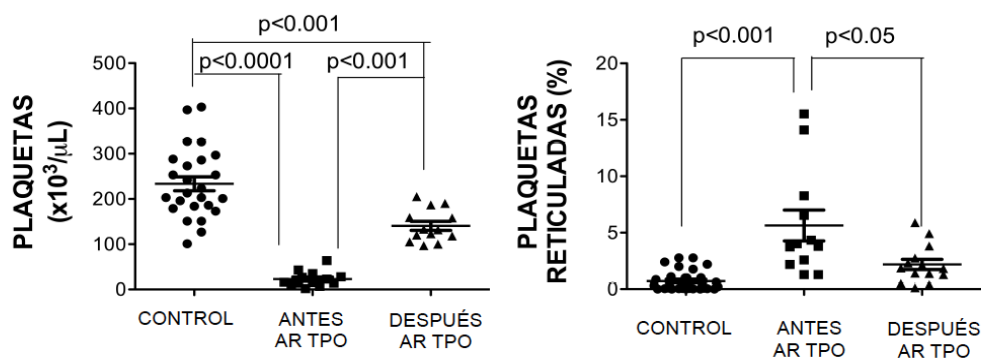
**Tabla 9. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con AR-TPO.**

Nº	EDAD (años)	Género	Tiempo desde el diagnóstico (años)	Tratamientos previos	AR TPO (E, R) Dosis inicial	AR TPO (E, R) Dosis al tomar muestra	Tiempo de respuesta (semanas)	Tratamientos concomitantes	Número de plaquetas al inicio del tratamiento ( $\times 10^9/L$ )	Número de plaquetas tras responder al AR TPO ( $\times 10^9/L$ )
1.	81	F	11	Corticoides, IGIV, Azatioprina	E 25 mg/d	E 25 mg/48h	1	Corticoides	43	158
2.	43	F	3.3	Corticoides, IGIV	E 50 mg/d	E 25 mg/d	1	IGIV	64	190
3.	38	M	35	Corticoides, IGIV, Azatioprina, Esplenectomía	E 50 mg/d	E 50 mg/d	7	IGIV	11	120
4.	79	F	24	Corticoides, IgGIV	E 50 mg/d	E 50 mg/d	1	-	14	118
5.	72	M	19	Corticoides, IGIV	E 50 mg/d	E 25 mg/48h	9	-	2	97
6.	73	F	6.5	Corticoides, IGIV, Rituximab, <b>Romiplostim</b>	E 50 mg/d	E 75 mg/d	2	-	28	133
7.	39	F	5.5	Corticoides, IGIV	E 50 mg/d	E 75 mg/d	7	-	23	100
8.	80	F	3.3	Corticoides, IGIV, <b>Romiplostim</b>	E 50 mg/d	E 50 mg/d	5	IGIV	7	187
9.	52	F	15.5	Corticoides, IGIV	E 50 mg/d	Nada	4	IGIV	16	105
10.	70	M	8.8	Corticoides, IGIV, Dapsona, Esplenectomía	E 50 mg/d	E 25 mg/d	4	-	29	132
11.	77	M	4.5	Corticoides, IGIV	E 50 mg/d	E 25 mg/72h	3	IGIV	14	159
12.	81	M	2.5	Corticoides, IGIV, <b>Eltrombopag</b>	R 3 $\mu\text{g/kg/S}$	R 3 $\mu\text{g/kg/S}$	9	IGIV	15	205
13.	42	M	3.5	Corticoides, IGIV, Rituximab	E 50 mg/d	E 25 mg/d	1	-	27	123

*E: eltrombopag; R: romiplostim; Ig IV: inmunoglobulina intravenosa. Tiempo de respuesta: tiempo hasta que el número de plaquetas se mantiene a  $\geq 30 \times 10^9/L$  sin tratamiento adicional. h: horas. d: días. Dos de los pacientes habían recibido previamente tratamiento con romiplostim y tuvieron que cambiar su tratamiento a eltrombopag porque uno de ellos presentó depresión severa como efecto adverso (paciente 6) y en el otro hubo dificultades para ajustar la dosis (paciente 8). Otro paciente (paciente 12) comenzó a ser tratado con Eltrombopag pero al no tener efecto tuvo que ser cambiado a Romiplostim.*

### 5.11.2. Recuento total de plaquetas y de plaquetas inmaduras.

El recuento de plaquetas en el grupo de PTI antes de ser tratados con AR TPO fue más bajo que en el grupo control mientras que la proporción de plaquetas inmaduras en estos pacientes fue mayor (Figura 39).



**Figura 39.** Recuento de plaquetas (panel de la izquierda) y porcentaje de plaquetas reticuladas (panel de la derecha) en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder al tratamiento con los AR-TPO. Cada símbolo representa a un sujeto. La comparación entre los grupos de pacientes con PTI y el grupo control realizó por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn, y la comparación de los pacientes con PTI antes y después de responder al tratamiento con los AR TPO por test “t” de Student para muestras pareadas.

El nivel plasmático de TPO fue mayor en los pacientes con PTI antes del tratamiento con los AR TPO que en los controles sanos, pero no significativamente diferente de los valores del grupo después de responder a estos fármacos (Figura 40).

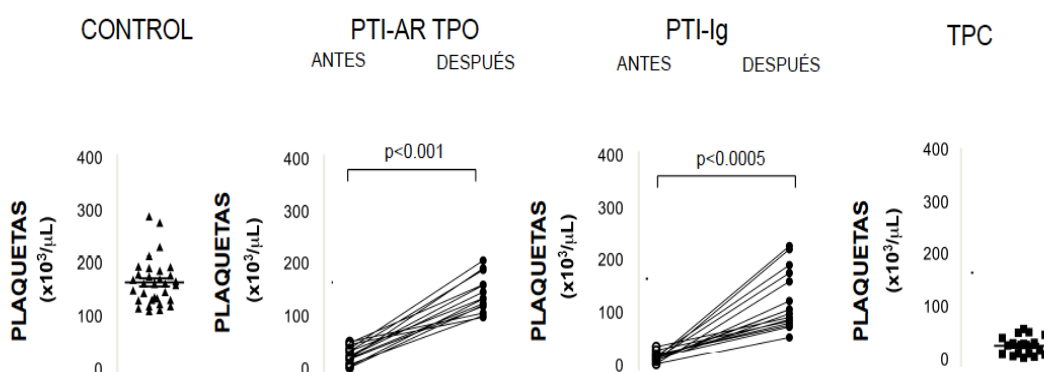




**Tabla 10. Características de los pacientes con PTI tratados con AR-TPO e IGIV.**

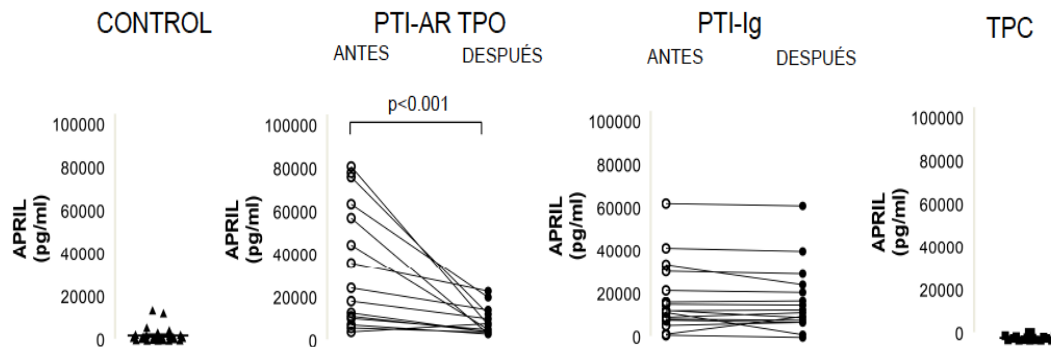
AR TPO	Ig IV
Edad media, años (rango) 63 (38-81)	Edad media, años (rango) 70 (51-81)
Género Masculino, Nº (%) 7 (54%)	Género Masculino, Nº (%) 3 (18%)
Tratamiento previo	Tratamiento previo
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esteroides, Nº (%) 13 (100%)</li> <li>• Rituximab, Nº (%) 2 (15%)</li> <li>• Azatioprina Nº (%) 2 (15%)</li> <li>• Esplenectomía, Nº (%) 2 (15%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esteroides, Nº (%) 17 (100%)</li> <li>• Rituximab Nº (%) 2 (12%)</li> <li>• Azatioprina Nº (%) 2 (12%)</li> <li>• Esplenectomía, Nº (%) 5 (29%)</li> </ul>
Tratamiento concomitante	Tratamiento concomitante
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esteroides, Nº (%) 1 (7%)</li> <li>• Ig IV, Nº (%) 6 (46%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esteroides, Nº (%) 6 (35%)</li> </ul>

La Figura 41 muestra el número de plaquetas en los distintos grupos estudiados. Los pacientes con PTI y trombocitopenia tratados con AR TPO e IG IV aumentaron su número de plaquetas tras los tratamientos.



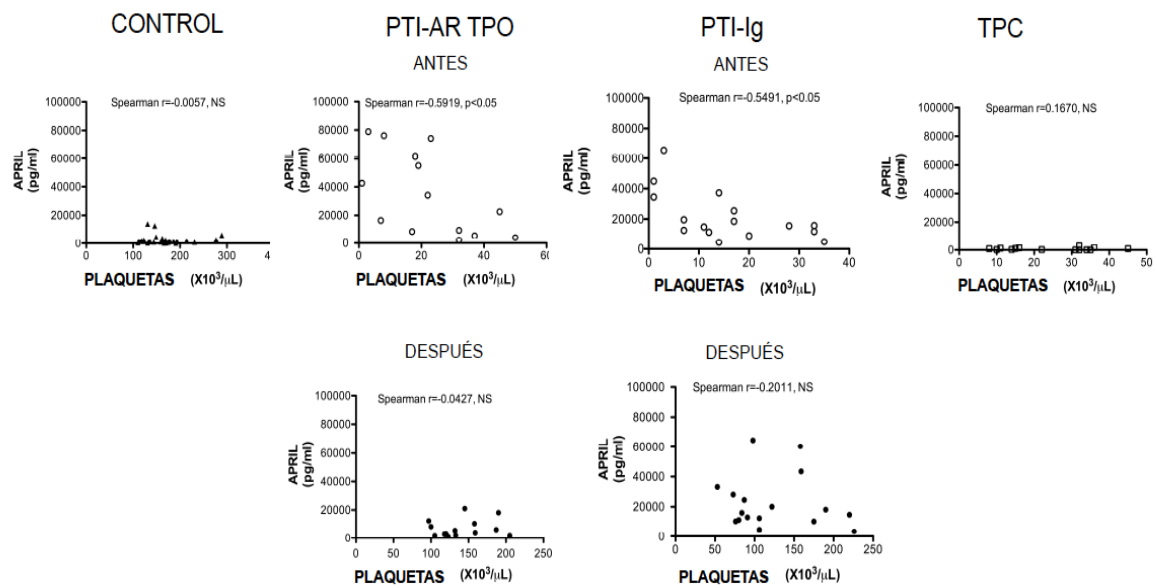
**Figura 41. Recuento de plaquetas en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder al tratamiento con los AR-TPO o IGIV y con TPC. Cada símbolo representa a un sujeto. La comparación de los pacientes con PTI antes y después de responder a los tratamientos con los AR-TPO o con las Ig se realizó con el test “t” de Student para muestras pareadas.**

Los niveles de APRIL que estaban más elevados en los pacientes con PTI que en los controles y en los pacientes con TPC, disminuyeron tras el tratamiento con los AR TPO, pero no con IGIV (Figura 42).



**Figura 42. Niveles de APRIL en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder a los tratamientos con los AR-TPO o IGIV y con TPC. Cada símbolo representa a un sujeto. La comparación de los pacientes con PTI antes y después de responder a los tratamientos con los AR-TPO o con las Ig se realizó con el test “t” de Student para muestras pareadas.**

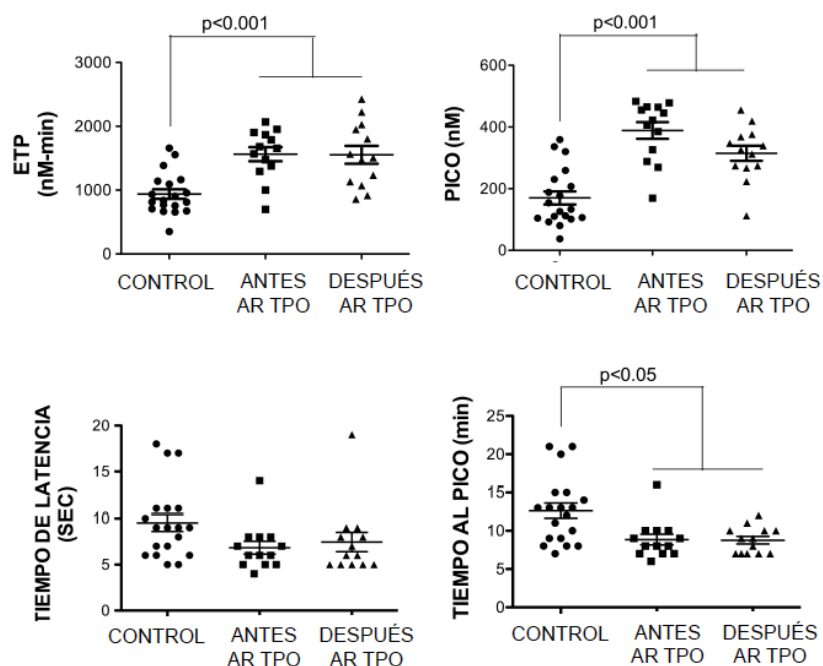
Todos los pacientes con PTI y trombocitopenia tuvieron mayores niveles plasmáticos APRIL que el grupo control ( $p < 0,01$ ), que se correlacionaba inversamente con el recuento de plaquetas. Esta correlación desapareció cuando los pacientes recuperaron el número de plaquetas (Figura 43).



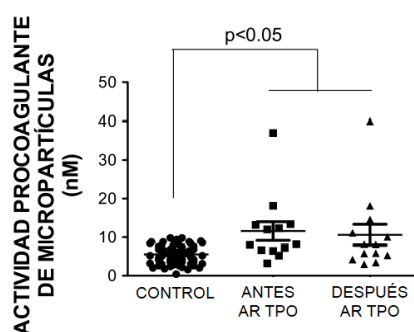
**Figura 43.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a los niveles plasmáticos de APRIL y el número de plaquetas en los distintos grupos. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ).

#### 5.11.4. Efecto del tratamiento con los AR-TPO sobre la capacidad procoagulante asociada a micropartículas y al plasma en pacientes con PTI.

La capacidad procoagulante del plasma y la asociada a micropartículas fueron mayores en los pacientes con PTI que en los controles y el tratamiento con AR TPO no cambió estos perfiles procoagulantes (Figuras 44 y 45).



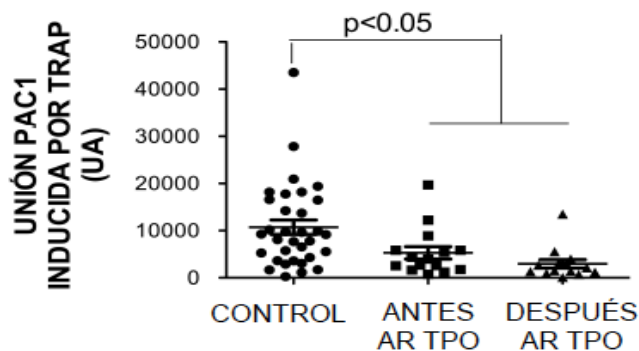
**Figura 44. Generación de trombina en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder a los tratamientos con AR-TPO.** Cada símbolo representa a un sujeto. La comparación entre los grupos de pacientes con PTI y el grupo control se realizaron por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn, y la comparación de los pacientes con PTI antes y después de responder al tratamiento con los AR-TPO con el test “t” de Student para muestras pareadas.



**Figura 45. Capacidad procoagulante asociada a micropartículas en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder a los tratamientos con AR-TPO.** La comparación entre los grupos de pacientes con PTI y el grupo control se realizó por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn, y la comparación de los pacientes con PTI antes y después de responder al tratamiento con los AR-TPO con el test “t” de Student para muestras pareadas.

### 5.11.5. Efecto del tratamiento con AR-TPO sobre la expresión del receptor del Fg en la superficie de las plaquetas y su activación en pacientes con PTI

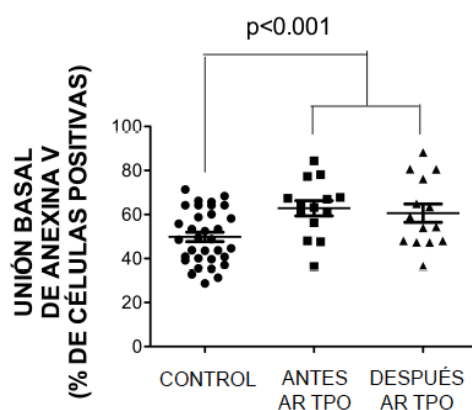
Como mencionamos anteriormente las plaquetas de los pacientes con PTI tenían una menor capacidad de respuesta al TRAP en comparación con los controles que no fue modificada por el tratamiento con los AR TPO (Figura 31). Estos fármacos tampoco modificaron la expresión del receptor de Fg en la superficie de las plaquetas (datos no mostrados).



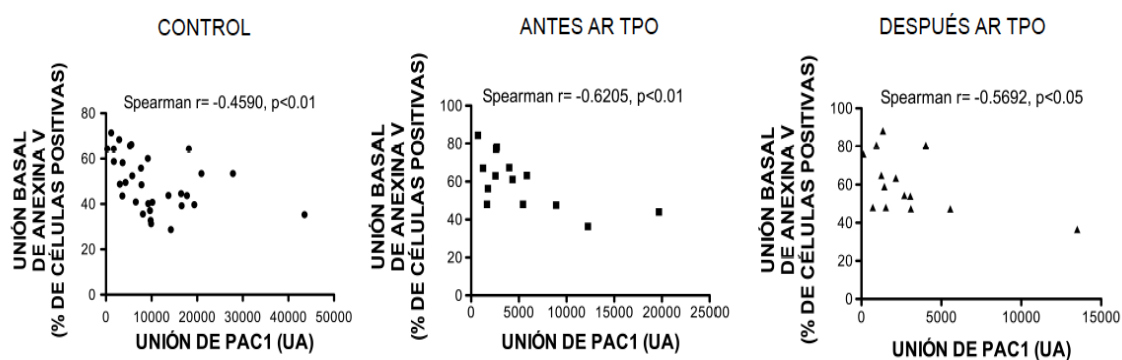
**Figura 46. Capacidad de activación del receptor de Fg en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder a los tratamientos con AR-TPO.** La comparación entre los grupos de pacientes con PTI y el grupo control se realizó por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn, y la comparación de los pacientes con PTI antes y después de responder al tratamiento con los AR-TPO con el test “t” de Student para muestras pareadas.

### 5.11.6. Efecto del tratamiento con los AR-TPO sobre la exposición de fosfatidilserina en la superficie de las plaquetas y su relación con la la capacidad de activación de las plaquetas en pacientes con PTI

Las plaquetas de los pacientes con PTI antes y después de responder al tratamiento con los AR-TPO exponían más fosfatidilserina en su superficie que los controles sanos (Figura 47) y este hecho pareció condicionar la capacidad de activación del receptor de fibrinógeno (Figura 48).



**Figura 47.** Exposición de fosfatidilserina en la superficie de las plaquetas en los grupos control y de pacientes con PTI antes y después de responder a los tratamientos con AR-TPO. La comparación entre los grupos de pacientes con PTI y el grupo control se realizó por ANOVA de un factor con el test a posteriori de Dunn, y la comparación de los pacientes con PTI antes y después de responder al tratamiento con los AR TPO con el test “t” de Student para muestras pareadas.



**Figura 48.** Representación de los diagramas de dispersión de puntos correspondientes a la unión de Anexina V y la unión de PAC1. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) y de la variable estadística “ $p$ ” cuando esta es significativa ( $p < 0.05$ ).





## **6. DISCUSIÓN**



## **6. Discusión**

### **6.1. Recuento de plaquetas en los distintos grupos experimentales**

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue establecer las características diferenciales de la hemostasia entre pacientes con trombocitopenia de origen periférico (PTI) y pacientes con trombocitopenia de origen central (post-tratamiento con quimioterapia o SMD). El hecho de que no existiesen diferencias significativas en el número de plaquetas observado en los pacientes con PTI y trombocitopenia, y en los que tenían TPC, validó estas cohortes para desarrollar nuestro trabajo. De esta manera, las diferencias en la hemostasia que pudiésemos encontrar entre estos grupos, no podría adjudicarse al número de plaquetas. Por otra parte, el recuento de plaquetas en pacientes con PTI y con TPC, difirió de forma significativa con la cifra de plaquetas que presentaban tanto el grupo control como el grupo de pacientes con PTI-Pts normales.

### **6.2. Niveles de TPO en los diferentes grupos estudiados**

La diferenciación de los megacariocitos y la producción de las plaquetas están controladas por la TPO [91, 92]. Nuestros resultados mostraron que los niveles plasmáticos de TPO estaban elevados en los pacientes con trombocitopenia, tanto en los de PTI y como en los de TPC, mientras que en los controles sanos y en los pacientes con PTI-Pts normales los niveles de TPO fueron casi indetectables. Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que los pacientes con SMD pero con número normal de plaquetas también tenían niveles indetectables de TPO [93], lo que difiere de lo comunicado por Tamura y Ogata, quienes observaron concentraciones plasmáticas de TPO elevadas en todos los pacientes con SMD independientemente de su número de plaquetas [94].

El aumento en los niveles de TPO fue más pronunciado en los pacientes con TPC que en los de PTI. Esto puede deberse a la displasia/aplasia de la médula ósea de los pacientes con TPC, lo que hace que ésta sea más refractaria al estímulo por TPO. En apoyo de esta hipótesis se ha publicado recientemente el uso de Eltrombopag [95, 96] y de Romiplostim [97] para el tratamiento de los pacientes con SMD, en dosis más elevadas que las utilizadas para el tratamiento de pacientes con PTI. También se ha referido el uso de los agonistas de TPO en combinación con lenalidomida y decitabina [98]

Otra posibilidad para explicar el hecho de que los niveles de TPO sean más altos en los pacientes con TPC que en los de PTI, podría ser la existencia en estos últimos de una alteración en el mecanismo de retroalimentación entre el número de plaquetas y los niveles plasmáticos de TPO. Esta última observación llevó a cambiar la teoría sobre la etiopatogenia de la PTI, involucrando no sólo a la destrucción periférica de las plaquetas, sino también a una producción insuficiente de las mismas [27, 99]. Con esta hipótesis comenzaron los estudios de desarrollo de los AR-TPO para el tratamiento de la PTI. Estos fármacos actúan sobre los receptores de TPO estimulando la megacariopoyesis ya que los niveles endógenos de TPO son insuficientes.

Cabe señalar que, si bien los niveles plasmáticos de TPO en los pacientes con PTI y trombocitopenia eran más bajos de lo esperado, se observó en este grupo, y no en los de TPC, una correlación negativa entre el número de plaquetas y los niveles de TPO. Este hecho pone de manifiesto el marcado trastorno de la hematopoyesis en los pacientes con TPC y no en los pacientes con PTI.

### **6.3. Plaquetas inmaduras o reticuladas en las trombocitopenias de las diferentes etiologías**

Las plaquetas recién liberadas a la circulación pueden mantener por un corto período de tiempo pequeñas cantidades de ARN. Las plaquetas con estas características se consideran plaquetas inmaduras o reticuladas y su porcentaje se utiliza como indicador de la velocidad de producción de las mismas [100, 101].

Los pacientes con PTI tenían un porcentaje más alto de plaquetas inmaduras que los sujetos sanos y que los pacientes con TPC, lo que sugirió la existencia de una megacariopoyesis parcialmente eficaz en los pacientes con PTI que intenta compensar la destrucción periférica de las plaquetas con un aumento en su producción. Esta hipótesis se vio sustentada por la observación de que cuanto más alto era el nivel de TPO en los pacientes con PTI, mayor el porcentaje de plaquetas inmaduras.

Varios trabajos sugieren que uno de los motivos por el que los pacientes con PTI tienen un fenotipo hemorrágico leve a pesar de su baja cifra de plaquetas, es su alto porcentaje de plaquetas reticuladas. Estas plaquetas inmaduras son más grandes y más jóvenes, y por tanto más reactivas que las de los sujetos sanos [86-88].

Por el contrario, en los pacientes con TPC el número de plaquetas inmaduras no estaba aumentado, indicando un fallo funcional en la médula ósea. Este hecho combinado con el hallazgo de niveles altos de TPO en este grupo, pone de manifiesto un patrón de trombocitopenia hipoplásica en estos pacientes [102].

Todos estos resultados sugieren que, a diferencia de los pacientes con TPC, los pacientes con PTI tienen una megacariopoyesis funcional, aunque algo alterada por la acción de los anticuerpos circulantes [54].

#### **6.4. Niveles plasmáticos de APRIL**

Los pacientes con PTI de las cohortes de nuestro estudio, independientemente de que en ese momento presentaran o no trombocitopenia, presentaban niveles elevados de APRIL. Esto resalta el mecanismo autoinmune de la enfermedad, en la cual se produce una destrucción acelerada de plaquetas mediada por anticuerpos. Los niveles elevados de APRIL en la PTI y no en las trombocitopenias de origen central como en los SMD, favorecerían la proliferación y diferenciación de los linfocitos B y, por lo tanto, la respuesta inmune mediada por anticuerpos [81].

En apoyo de la participación del APRIL en la etiopatogenia de la PTI observamos una correlación inversa entre los niveles de APRIL y el número de plaquetas en estos pacientes. Este hallazgo sugiere que los niveles plasmáticos de APRIL podrían utilizarse como marcador de actividad de la PTI.

#### **6.5. Características funcionales de las plaquetas en los grupos de estudio**

Si bien el número de plaquetas es un factor importante en el riesgo de sangrado, estudios previos han demostrado que no es el único factor involucrado en el mismo [103, 104].

Diferencias en la capacidad de activación plaquetaria podrían ayudar a explicar el diferente fenotipo hemorrágico observado en los pacientes con PTI y con TPC [103-105].

Nuestros resultados mostraron una disminución en la activación de las plaquetas inducida por agonistas y evaluada a través de la activación del receptor de Fg, tanto en pacientes con PTI como con TPC. Adicionalmente, los pacientes con TPC presentaron una disminución en la expresión de P-selectina. En esta cohorte, la disminución de la activación del receptor del Fg, dependió de forma directa del número de plaquetas que tenía el paciente, lo cual no ocurrió con la expresión de P-selectina. En contraposición con estos resultados, Panzer encontró diferencias en la expresión de P-selectina entre los sujetos con PTI y los controles sanos [106].

La disminución de la capacidad de activación de las plaquetas de los pacientes con PTI y con TPC no se debió a un menor número de receptores para el Fg en la superficie de las plaquetas de estos pacientes, ya que su evaluación por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las dos subunidades de dicho receptor, mostró que su expresión era comparable a la observada en las plaquetas de los controles sanos. Resultados similares fueron comunicados por Sandes [107] pero difirieron de los publicados por Psaila, quien observó que las plaquetas de los pacientes con TPC tenían menos receptores para el Fg que las plaquetas de los pacientes con PTI o de los controles sanos [108].

El hecho de que las plaquetas de los pacientes con TCP tuviesen una activación y un mecanismo de degranulación (expresión de la P-selectina tras la activación) anómalos podría explicar por qué estos pacientes tienen un fenotipo hemorrágico más grave que los pacientes con PTI.

## **6.6. Presencia de signos de apoptosis en las plaquetas**

Las plaquetas pueden sufrir apoptosis desencadenada por eventos extrínsecos e intrínsecos [109]. Nuestros resultados mostraron que las plaquetas de los pacientes con PTI y las de los pacientes con TPC expresaban más signos de apoptosis, medidos como expresión de fosfatidilserina, que los controles sanos.

Trabajos previos han comunicado que la fosfatidilserina también se expresa en estados en los que las plaquetas han sido activadas por diferentes agonistas [110]. Por este motivo, podríamos pensar que este aumento de PS podía deberse a que estas plaquetas estuvieran más activadas y no a que fueran más apoptóticas. Sin embargo, y tal y como hemos demostrado previamente, las plaquetas de los pacientes con PTI y con TPC presentaban una disminución de la activación, por lo que podemos concluir que este aumento en la expresión de PS es un cambio asociado a la apoptosis. Resultados referidos por Winkler y por nuestro laboratorio mostraron que incrementos en la actividad de las caspasas 3, 7, 8 y 9 estaban involucrados en la apoptosis plaquetaria en pacientes con PTI y con SMD. Las caspasas son cisteinil-aspartato-proteasas responsables de la expresión en la superficie celular de señales que implican daño celular, como es la exposición de PS en el exterior de las células [93, 111, 112].

En ambos grupos de pacientes con trombocitopenia observamos que las plaquetas que expresaban más PS tenían más dificultad para ser activadas por agonistas como el TRAP. Este hecho sugiere una relación directa entre la apoptosis y la disfunción plaquetaria. En concordancia con estos resultados, se ha observado que la inhibición de la proteína anti-



apoptótica Bcl-xL en ratones producía la disminución de la capacidad de activación del receptor de Fg y una mayor exposición de PS en la superficie de las plaquetas [113].

Sólo en los pacientes con TCP se observó una correlación inversa entre el número de plaquetas y la exposición de PS. Este hecho sugiere un trastorno grave en la megacariopoyesis ya que cuanto mayor era la dificultad para producir las plaquetas, más anomalías presentaron en su función.

### **6.7. Capacidad procoagulante asociada a micropartículas**

A pesar de la baja cifra de plaquetas y de la disfuncionalidad de las mismas, el número de sangrados observado fue bajo fundamentalmente en los pacientes con PTI, hecho que coincide con lo referido por estudios previos [59, 93, 114].

Creímos de interés buscar otros factores que pudieran modificar el fenotipo hemorrágico de estos pacientes, por lo que especulamos sobre la posible participación de las MPs en este evento. La liberación de MPs por acción de diferentes enzimas como la escramblasa, haría que estas MPs ofrecieran una superficie catalítica para diferentes factores de coagulación, facilitando así la formación de trombina y acelerando la formación del trombo [115-117].

Observamos que la capacidad procoagulante asociada a MPs era mayor en los pacientes con PTI y TPC que en los controles sanos, lo que podría explicar el menor número de episodios hemorrágicos de lo cabría esperar en estos pacientes.

En los pacientes con PTI la capacidad procoagulante asociada a MPs era mayor cuanto menor era el número de plaquetas. Las MPs podrían provenir de las plaquetas destruidas

por los anticuerpos, ya que existía una relación directa entre la actividad procoagulante de las MPs y los niveles plasmáticos de APRIL.

Sin embargo, en los pacientes con TPC ocurre lo contrario, la capacidad procoagulante del plasma asociada a MPs era más alta en los pacientes con mayor número de plaquetas, a más plaquetas más MPs.

Las MPs se liberan por activación o por apoptosis celular. Nuestros resultados sugirieron que en los pacientes con PTI y con TPC las MPs eran producidas por un aumento de la apoptosis y no por un aumento de la activación plaquetaria, ya que esta última estaba disminuida en ambos grupos. Evaluamos en nuestras cohortes de pacientes la posible existencia de una relación entre la actividad procoagulante asociada a MPs y el grado de apoptosis plaquetaria, medido este último por la expresión de PS en la superficie de las plaquetas y observamos que esta relación sólo existía en el grupo control. Esto podría deberse a que las MPs en los controles fuesen principalmente de origen plaquetario mientras que en los pacientes con PTI y con TPC proviniesen de otro o de más de un tipo celular.

#### **6.8. Caracterización del origen celular de las MPs en las diferentes poblaciones estudiadas.**

Teniendo en cuenta los resultados mencionados anteriormente decidimos determinar el origen celular de las MPs en los grupos en estudio.

Las MPs de los pacientes con PTI provenían principalmente de las plaquetas. El hecho de que existiese una correlación negativa entre el número de plaquetas en estos pacientes y

el número de MPs provenientes de este tipo celular apoya la hipótesis de que las plaquetas fueron destruidas periféricamente.

Por otra parte, los pacientes con PTI que presentaban en ese momento trombocitopenia, tenían además un aumento en el porcentaje de MPs procedente de glóbulos rojos. Resultados similares fueron comunicados recientemente por otros autores con una población muestral más pequeña que la nuestra [118]. A diferencia de lo observado con las plaquetas, no encontramos ninguna relación entre el porcentaje de MPs de origen eritrocitario y el número absoluto de glóbulos rojos.

En relación a los pacientes con TPC, confirmamos nuestra hipótesis de que el aumento de la actividad procoagulante asociada a MPs no era debida a las MPs derivadas de las plaquetas. Demostramos que las MPs en estos pacientes derivaban fundamentalmente de los monocitos aunque no encontramos relación entre la cantidad de MPs y su recuento.

La diferencia en el origen celular de las MPs de los pacientes con PTI y con TPC explica que hayamos encontrado actividad procoagulante asociada al FT de las MPs en las de los pacientes con TPC y no en las del grupo de PTI, ya que en este último caso las MPs provenían de las plaquetas y de los glóbulos rojos, tipos celulares que no expresan FT [119-121].

#### **6.9. Capacidad procoagulante del plasma en pacientes con PTI o con TPC.**

Nuestros experimentos pusieron de manifiesto que los pacientes con PTI, independientemente de si tenían o no en ese momento trombocitopenia, tenían mayor capacidad de generar trombina que los controles y los pacientes con TPC.

Esto explicaría el hallazgo clínico comunicado por otros grupos en los que, paradójicamente, los enfermos con PTI tenían hasta dos veces más de riesgo de trombosis que la población general [122].

Encontramos un incremento en los niveles de FVII y de FXII en pacientes con PTI que podría justificar el aumento de la generación de trombina. Sin embargo, a diferencia de otros trabajos publicados, no encontramos elevación de otros factores de la coagulación tales como el FVIII, el FIX y el FXI [118].

#### **6.10. Efecto del tratamiento con AR-TPO sobre la hemostasia en pacientes con PTI.**

Desde que los AR-TPO (Romiplostim y Eltrombopag) se aprobaron para el tratamiento de la PTI varios estudios pre y postautorización se han centrado en analizar su eficacia y seguridad, intentando valorar sus efectos adversos a largo plazo [82, 84].

##### **6.10.1. Valoración de la eficacia**

Observamos que cuando los pacientes respondían a estos fármacos, el número absoluto de plaquetas aumentaba y descendía el número de plaquetas reticuladas que estaba previamente aumentado como mecanismo compensatorio. Este descenso en el número de plaquetas reticuladas se ha propuesto como marcador para predecir en qué pacientes se podría retirar el tratamiento con AR-TPO y el recuento de plaquetas permanecería estable.

##### **6.10.2. Efecto sobre la función plaquetaria y la actividad procoagulante.**

Uno de los efectos secundarios más temido de estos fármacos es la posibilidad de aumentar de incidencia de trombosis en una población en la que, paradójicamente a

pesar de la trombocitopenia, este riesgo es elevado. Trabajos recientes como el de Norgaard revelan que los pacientes con PTI crónica presentan un aumento en la incidencia de los eventos tromboembólicos venosos hasta casi el doble con respecto a la población general, incluso aunque el paciente con PTI tenga en ese momento cifras bajas de plaquetas [122]. También se ha especulado con una posible hiperreactividad de las plaquetas en los pacientes con PTI debido a la presencia en la sangre periférica de plaquetas más jóvenes y de mayor tamaño, lo cual justificaría los escasos episodios hemorrágicos graves en relación al número de plaquetas de estos pacientes [123]. Por último, varios grupos de trabajo han comunicado que la estimulación *in vitro* del receptor para la TPO (R-TPO) presente en la superficie de las plaquetas circulantes, aumenta su reactividad a varios agonistas, como el ADP, la trombina y el colágeno [124-126].

Estas observaciones nos llevaron a pensar que sería interesante investigar si los AR-TPO aumentaban aún más el riesgo tromboembólico en los pacientes con PTI crónica. Por ello estudiamos si estos fármacos modificaban la funcionalidad plaquetaria o si aumentaban la capacidad procoagulante del plasma.

Se han publicado escasos estudios sobre el efecto de los AR-TPO sobre la activación plaquetaria. Estudios de fase I en los que se administraba Eltrombopag a controles sanos y, por tanto, con un recuento normal de plaquetas, no pusieron en evidencia cambios en la activación plaquetaria en respuesta a ADP [127]. Nuestros resultados y los de otros investigadores mostraron que no existían diferencias en la expresión del receptor de Fg entre los pacientes con PTI y los controles, pero sí una disminución de la respuesta a la activación por TRAP [123, 128] y, a diferencia de lo comunicado por Psalia, nosotros no

observamos que el tratamiento Eltrombopag mejorara la activación plaquetaria por TRAP [128].

Como mencionamos anteriormente, las plaquetas de los pacientes con PTI exponían más PS que los controles sanos, hecho que las hace basalmente más reactivas que las de los controles por aportar una superficie de anclaje para los factores de coagulación. El tratamiento con los AR-TPO no aumentó esta hiperreactividad, independientemente de que el paciente respondiese o no al tratamiento.

Nuestros resultados confirmarían las conclusiones de los ensayos clínicos realizados con Eltrombopag, en los que no se mostró un claro incremento de la incidencia de los episodios tromboembólicos en los pacientes con PTI crónica tratados con este fármaco respecto a los tratados con placebo [129, 130].

El incremento en la actividad procoagulante asociada a MPs y a diferentes factores plasmáticos observado en los pacientes con PTI crónica, no se modificó tras la administración de los AR-TPO.

Otros estudios han utilizado el Dímero-D como marcador de la activación de la coagulación en pacientes con PTI, revelando que hay un descenso de los niveles de Dímero-D después de responder al tratamiento con AR-TPO, aunque los autores reconocen la limitación que tiene evaluar el estado protrombótico con un solo marcador como el Dímero-D [131]. Por otra parte, otro estudio ha comunicado un aumento en los niveles plasmáticos de los factores de la coagulación FVIII, FIX y FXI en pacientes con PTI [118]. Sin embargo esto por sí sólo no explicaría el aumento del ETP ni del pico de la generación de trombina, ya que los niveles de los factores VIII, IX y XI no influyen en los

resultados del CAT cuando éste se realiza, como en nuestro caso, con FT 1 pM, lo que indica la posible participación de otros factores [132].

La trombocitopenia tampoco fue la responsable del aumento en la generación de trombina. En este sentido, un trabajo reciente de nuestro grupo demostró que la generación de trombina en el plasma de pacientes con trombocitopenia y SMD era similar a la de los controles sanos [93].

Podríamos especular que la administración de AR-TPO no aumenta el riesgo de sufrir episodios tromboembólicos en los pacientes con PTI ya que el aumento de la actividad procoagulante del plasma en estos pacientes podría ser compensado por la dificultad en la capacidad de activación de sus plaquetas incluso aunque recuperasen su recuento.

El hallazgo de que todos los pacientes con PTI y trombocitopenia tenían niveles de APRIL en plasma más elevados que los pacientes con TPC (SMD) y el grupo control apoya el papel del APRIL, ya comunicado por otros grupos, en el mecanismo etiopatogénico de la enfermedad [80]. Además observamos, que en los pacientes con PTI los niveles de APRIL se correlacionaban inversamente con el número de plaquetas.

El tratamiento de los pacientes con PTI con los AR-TPO disminuyó los niveles plasmáticos de APRIL, lo cual no ocurrió cuando fueron tratados con IGIV [81]. Trabajos previos como el de Gu describieron niveles de APRIL dentro de la normalidad en pacientes con PTI sin trombocitopenia a los que se les había practicado una esplenectomía o habían sido tratados con corticoides [81, 133]. En nuestro grupo de pacientes tratados con AR-TPO, sólo dos habían sido esplenectomizados previamente y uno estaba recibiendo tratamiento concomitante con corticoides, por lo que dedujimos que el descenso en los

niveles de APRIL no era debido ni de a la esplenectomía ni al uso de corticoides sino al tratamiento con AR-TPO.

Estos resultados sugieren que los AR-TPO podrían poseer una actividad inmunomoduladora además de su efecto en el aumento de la megacariopoyesis. Este efecto sobre el sistema inmune ha sido previamente comunicado por Bao [79]. Otros estudios han mostrado que los pacientes que responden al tratamiento con los AR-TPO presentan un aumento en los niveles de *transforming growth factor-β1*, una citoquina que inhibe la proliferación de los linfocitos B así como la producción de anticuerpos [134].

La importancia de esta observación da valor a este estudio a pesar del pequeño tamaño de la muestra, y da apoyo a la necesidad de llevar a cabo un estudio con mayor número de pacientes.



## **7. CONCLUSIONES**



## 7. Conclusiones

- 7.1. El mecanismo etiopatogénico de la PTI es la suma de una destrucción periférica y de una disminución de la megacariopoyesis producida por niveles inadecuados de TPO. A pesar de esta disfunción en el mecanismo compensatorio de la TPO, tienen un alto número de plaquetas reticuladas o inmaduras, lo cual indica que su defecto en la megacariopoyesis no es tan importante como en los pacientes con TPC, donde existe una grave disfunción medular puesta de manifiesto por el bajo número de plaquetas reticuladas circulantes a pesar de niveles de TPO altos.
- 7.2. Tanto las plaquetas de los pacientes con PTI como con TPC tienen una menor capacidad de ser activadas por agonistas que parece deberse a un aumento en su apoptosis. Sólo en los pacientes con TPC existe una correlación entre el grado de apoptosis y el número de plaquetas, lo cual sugiere una profunda dishematopoyesis compatible con el origen central de estas trombocitopenias.
- 7.3. Los pacientes con PTI presentan un aumento en la capacidad procoagulante del plasma, así como de la asociada a MPs procedentes de plaquetas y glóbulos rojos. Este hecho podría explicar por qué las manifestaciones hemorrágicas en estos pacientes son menores que en los pacientes con TPC a igual grado de trombocitopenia.
- 7.4. La respuesta al tratamiento con AR-TPO de los pacientes con PTI no implica una mejora de la funcionalidad plaquetaria y tampoco aumenta el riesgo de trombosis.
- 7.5. Los AR-TPO podrían poseer una actividad inmunomoduladora además de su efecto estimulante de la producción de plaquetas.



## **8. REFERENCIAS**



## 8. Referencias

1. Kaushansky, K., *Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis*. Blood, 2008. **111**(3): p. 981-6.
2. Vieira-de-Abreu, A., et al., *Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(1): p. 5-30.
3. Fernandez Bello, I., et al., *Platelet soluble CD40L and matrix metalloproteinase 9 activity are proinflammatory mediators in Behcet disease patients*. Thromb Haemost, 2012. **107**(1): p. 88-98.
4. Kelemen, E., I. Cserhati, and B. Tanos, *Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera*. Acta Haematol, 1958. **20**(6): p. 350-5.
5. Deutsch, V.R. and A. Tomer, *Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside*. Br J Haematol, 2013. **161**(6): p. 778-93.
6. Hitchcock, I.S. and K. Kaushansky, *Thrombopoietin from beginning to end*. Br J Haematol, 2014. **165**(2): p. 259-68.
7. Rivera, J., et al., *Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation*. Haematologica, 2009. **94**(5): p. 700-11.
8. Collier, B.S. and S.J. Shattil, *The GPIIb/IIIa (integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend*. Blood, 2008. **112**(8): p. 3011-25.
9. Zwaal, R.F. and A.J. Schroit, *Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1121-32.
10. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 47-59.
11. Gyulkhandanyan, A.V., et al., *Markers of platelet apoptosis: methodology and applications*. J Thromb Thrombolysis, 2012. **33**(4): p. 397-411.
12. Kroemer, G. and J.C. Reed, *Mitochondrial control of cell death*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 513-9.
13. Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner, *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 99-163.
14. Kile, B.T., *The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets*. Br J Haematol, 2014. **165**(2): p. 217-26.
15. Burnier, L., et al., *Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine*. Thromb Haemost, 2009. **101**(3): p. 439-51.
16. Polgar, J., J. Matuskova, and D.D. Wagner, *The P-selectin, tissue factor, coagulation triad*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1590-6.

17. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. N Engl J Med, 2008. **359**(9): p. 938-49.
18. Hoffman, M., *A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa*. Blood Rev, 2003. **17 Suppl 1**: p. S1-5.
19. Kitchen, S., et al., *New developments in laboratory diagnosis and monitoring*. Haemophilia, 2010. **16 Suppl 5**: p. 61-6.
20. Hemker, H.C., et al., *Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system*. Thromb Haemost, 2006. **96**(5): p. 553-61.
21. van Veen, J.J., A. Gatt, and M. Makris, *Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet?* Br J Haematol, 2008. **142**(6): p. 889-903.
22. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. WHO Classification of Tumours, V.I.W.C.o.T., No 2. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. ISBN-13 9789283224310 ISBN-10 9283224310. Order Number 17004002.
23. Greenberg, P., et al., *International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes*. Blood, 1997. **89**(6): p. 2079-88.
24. Stasi, R., *Immune thrombocytopenia: pathophysiologic and clinical update*. Semin Thromb Hemost, 2012. **38**(5): p. 454-62.
25. Stoll, D., et al., *Platelet kinetics in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and moderate thrombocytopenia*. Blood, 1985. **65**(3): p. 584-8.
26. Heyns Adu, P., et al., *Platelet turnover and kinetics in immune thrombocytopenic purpura: results with autologous <sup>111</sup>In-labeled platelets and homologous <sup>51</sup>Cr-labeled platelets differ*. Blood, 1986. **67**(1): p. 86-92.
27. Kosugi, S., et al., *Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol, 1996. **93**(3): p. 704-6.
28. Nichol, J.L., *Endogenous TPO (eTPO) levels in health and disease: possible clues for therapeutic intervention*. Stem Cells, 1998. **16 Suppl 2**: p. 165-75.
29. Abrahamson, P.E., et al., *The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura among adults: a population-based study and literature review*. Eur J Haematol, 2009. **83**(2): p. 83-9.
30. Schoonen, W.M., et al., *Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database*. Br J Haematol, 2009. **145**(2): p. 235-44.
31. Neylon, A.J., et al., *Clinically significant newly presenting autoimmune thrombocytopenic purpura in adults: a prospective study of a population-based cohort of 245 patients*. Br J Haematol, 2003. **122**(6): p. 966-74.
32. Segal, J.B. and N.R. Powe, *Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(11): p. 2377-83.



33. Rodeghiero, F., et al., *Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2386-93.
34. Provan, D., et al., *International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia*. Blood, 2010. **115**(2): p. 168-86.
35. George, J.N., et al., *Improved quality of life for romiplostim-treated patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: results from two randomized, placebo-controlled trials*. Br J Haematol, 2009. **144**(3): p. 409-15.
36. Snyder, C.F., et al., *Health-related quality of life of immune thrombocytopenic purpura patients: results from a web-based survey*. Curr Med Res Opin, 2008. **24**(10): p. 2767-76.
37. Imbach, P., T. Kuhne, and E. Signer, *Historical aspects and present knowledge of idiopathic thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol, 2002. **119**(4): p. 894-900.
38. Ahn, Y.S. and L.L. Horstman, *Idiopathic thrombocytopenic purpura: pathophysiology and management*. Int J Hematol, 2002. **76 Suppl 2**: p. 123-31.
39. Schwartz, R.S., *Immune thrombocytopenic purpura--from agony to agonist*. N Engl J Med, 2007. **357**(22): p. 2299-301.
40. Harrington, W.J., et al., *Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura*. J Lab Clin Med, 1951. **38**(1): p. 1-10.
41. van Leeuwen, E.F., et al., *Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia*. Blood, 1982. **59**(1): p. 23-6.
42. McMillan, R., L. Wang, and P. Tani, *Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP)*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(3): p. 485-91.
43. Stasi, R., *Pathophysiology and therapeutic options in primary immune thrombocytopenia*. Blood Transfus, 2011. **9**(3): p. 262-73.
44. Chong, B.H., *Primary immune thrombocytopenia: understanding pathogenesis is the key to better treatments*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(2): p. 319-21.
45. Emilia, G., et al., *Helicobacter pylori eradication can induce platelet recovery in idiopathic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2001. **97**(3): p. 812-4.
46. Olsson, B., et al., *T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1123-4.
47. Fogarty, P.F., et al., *T cell receptor VB repertoire diversity in patients with immune thrombocytopenia following splenectomy*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(3): p. 461-6.
48. Andre, S., et al., *Surveillance of antigen-presenting cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications*. Am J Pathol, 2009. **174**(5): p. 1575-87.
49. Zhou, B., et al., *Multi-dysfunctional pathophysiology in ITP*. Crit Rev Oncol Hematol, 2005. **54**(2): p. 107-16.

50. Carcao, M.D., et al., *Fcγ receptor IIa and IIIa polymorphisms in childhood immune thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol, 2003. **120**(1): p. 135-41.
51. Crow, A.R. and A.H. Lazarus, *Role of Fcγ receptors in the pathogenesis and treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura*. J Pediatr Hematol Oncol, 2003. **25 Suppl 1**: p. S14-8.
52. Crow, A.R., et al., *Mechanisms of action of intravenous immunoglobulin in the treatment of immune thrombocytopenia*. Pediatr Blood Cancer, 2006. **47**(5 Suppl): p. 710-3.
53. Chang, M., et al., *Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro*. Blood, 2003. **102**(3): p. 887-95.
54. McMillan, R., et al., *Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP*. Blood, 2004. **103**(4): p. 1364-9.
55. Stahl, C.P., D. Zucker-Franklin, and T.P. McDonald, *Incomplete antigenic cross-reactivity between platelets and megakaryocytes: relevance to ITP*. Blood, 1986. **67**(2): p. 421-8.
56. Houwerzijl, E.J., et al., *Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2004. **103**(2): p. 500-6.
57. Stasi, R., et al., *Long-term observation of 208 adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Am J Med, 1995. **98**(5): p. 436-42.
58. Kuhne, T., et al., *Newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: an observational study*. Lancet, 2001. **358**(9299): p. 2122-5.
59. Cohen, Y.C., et al., *The bleeding risk and natural history of idiopathic thrombocytopenic purpura in patients with persistent low platelet counts*. Arch Intern Med, 2000. **160**(11): p. 1630-8.
60. Cortelazzo, S., et al., *High risk of severe bleeding in aged patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Blood, 1991. **77**(1): p. 31-3.
61. Portielje, J.E., et al., *Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2549-54.
62. Stasi, R., *How to approach thrombocytopenia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2012. **2012**: p. 191-7.
63. Cines, D.B., et al., *The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity*. Blood, 2009. **113**(26): p. 6511-21.
64. Sanz, M.A., et al., *[Guidelines for diagnosis, treatment and monitoring of primary immune thrombocytopenia]*. Med Clin (Barc), 2012. **138**(6): p. 261 e1-261 e17.
65. Mazzucconi, M.G., et al., *Therapy with high-dose dexamethasone (HD-DXM) in previously untreated patients affected by idiopathic thrombocytopenic purpura: a GIMEMA experience*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1401-7.

66. Praituan, W. and P. Rojnuckarin, *Faster platelet recovery by high-dose dexamethasone compared with standard-dose prednisolone in adult immune thrombocytopenia: a prospective randomized trial*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(6): p. 1036-8.
67. Vianelli, N., et al., *Efficacy and safety of splenectomy in immune thrombocytopenic purpura: long-term results of 402 cases*. Haematologica, 2005. **90**(1): p. 72-7.
68. Kojouri, K., et al., *Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2623-34.
69. Arnold, D.M., et al., *Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura*. Ann Intern Med, 2007. **146**(1): p. 25-33.
70. Stasi, R., et al., *Variable patterns of response to rituximab treatment in adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3872-3.
71. Valent, P., et al., *Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference*. Leuk Res, 2007. **31**(6): p. 727-36.
72. Zaja, F., et al., *Lower dose rituximab is active in adults patients with idiopathic thrombocytopenic purpura*. Haematologica, 2008. **93**(6): p. 930-3.
73. Carson, K.R., et al., *Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project*. Blood, 2009. **113**(20): p. 4834-40.
74. Federal Drug Administration. FDAwarning.[http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/DrugSafetyNewsletter/RituximabmarketedasRituxan:Progressive Multifocal Leukoencephalopathy PML](http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/DrugSafetyNewsletter/RituximabmarketedasRituxan:ProgressiveMultifocalLeukoencephalopathyPML). Accessed December 14.
75. Li, J., et al., *Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin*. Blood, 2001. **98**(12): p. 3241-8.
76. Kuter, D.J., *New thrombopoietic growth factors*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4607-16.
77. Kuter, D.J., et al., *Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial*. Lancet, 2008. **371**(9610): p. 395-403.
78. Bussel, J.B., *Case studies of remission in adults with immune thrombocytopenia (ITP) following cessation of treatment with the TPO Receptor Agonist Romiplostim*. Abstracts. Hematology . 2013.
79. Bao, W., et al., *Improved regulatory T-cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents*. Blood, 2010. **116**(22): p. 4639-45.
80. Chong, B.H., *ITP: Tregs come to the rescue*. Blood, 2010. **116**(22): p. 4388-90.
81. Alvarez Roman, M.T., et al., *Effect of thrombopoietin-receptor agonists on a proliferation-inducing ligand (APRIL) plasma levels in patients with immune thrombocytopaenia*. Br J Clin Pharmacol, 2014. **78**(3): p. 674-6.

82. Rodeghiero, F., et al., *Long-term safety and tolerability of romiplostim in patients with primary immune thrombocytopenia: a pooled analysis of 13 clinical trials*. Eur J Haematol, 2013. **91**(5): p. 423-36.
83. Bussel, J.B., et al., *Effect of eltrombopag on platelet counts and bleeding during treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet, 2009. **373**(9664): p. 641-8.
84. Saleh, M.N., et al., *Safety and efficacy of eltrombopag for treatment of chronic immune thrombocytopenia: results of the long-term, open-label EXTEND study*. Blood, 2013. **121**(3): p. 537-45.
85. Neunert, C., et al., *The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia*. Blood, 2011. **117**(16): p. 4190-207.
86. Hayashi, S., et al., *[Reticulated platelet determination: methodologies and applications for the evaluation of thrombocytopenic disorders]*. Rinsho Ketsueki, 1999. **40**(3): p. 205-12.
87. Michelson A, L.M., Barnard MR, Furman MI, Frelinger AL. Flow Cytometry. In: Michelson A. ed. Platelets, 2nd edn. San Diego, CA:Elsevier/Academic Press, 2007:545-63.
88. Hemker, H.C., et al., *The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma*. Thromb Haemost, 2000. **83**(4): p. 589-91.
89. Morel, O., et al., *Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors*. Curr Opin Hematol, 2004. **11**(3): p. 156-64.
90. Freyssinet, J.M., *Cellular microparticles: what are they bad or good for?* J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1655-62.
91. Kuter, D.J., D.L. Beeler, and R.D. Rosenberg, *The purification of megapoietin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 11104-8.
92. Kaushansky, K., *Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production*. Blood, 1995. **86**(2): p. 419-31.
93. Martin, M., et al., *Platelet apoptosis and agonist-mediated activation in myelodysplastic syndromes*. Thromb Haemost, 2013. **109**(5): p. 909-19.
94. Tamura, H., et al., *Plasma thrombopoietin (TPO) levels and expression of TPO receptor on platelets in patients with myelodysplastic syndromes*. Br J Haematol, 1998. **103**(3): p. 778-84.
95. Mavroudi, I., et al., *Effect of the nonpeptide thrombopoietin receptor agonist eltrombopag on megakaryopoiesis of patients with lower risk myelodysplastic syndrome*. Leuk Res, 2011. **35**(3): p. 323-8.
96. Oliva EN, S.V., Zini G, Palumbo GA, Poloni A, Cortelezzi A, Voso MT, Molteni A, Sanpaolo G, Marino A, et al. Efficacy and safety of eltrombopag for the treatment of thrombocytopenia of low and intermediate-1 IPSS risk myelodysplastic syndromes: interim analysis of a prospective, randomized, single-blind, placebo-controlled trial (EQoL-MDS) Blood. 2012;120:20.

97. Kantarjian HM, M.G., Fenaux P, Sekeres MA, Szer J, Platzbecker U, Kuendgen A, Gaidano G, Wiktor-Jedrzejczak W, Bennett JM, et al. Treatment with the thrombopoietin (tpo)-receptor agonist romiplostim in thrombocytopenic patients (Pts) with low or intermediate-1 (int-1) risk myelodysplastic syndrome (MDS): Follow-up AML and survival results of a randomized, double-blind, placebo (PBO)-controlled study. *Blood*. 2012;120:8–11.
98. Townsley, D.M., et al., *Pathophysiology and management of thrombocytopenia in bone marrow failure: possible clinical applications of TPO receptor agonists in aplastic anemia and myelodysplastic syndromes*. *Int J Hematol*, 2013. **98**(1): p. 48-55.
99. Makar, R.S., et al., *Thrombopoietin levels in patients with disorders of platelet production: diagnostic potential and utility in predicting response to TPO receptor agonists*. *Am J Hematol*, 2013. **88**(12): p. 1041-4.
100. Cesari, F., et al., *Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy*. *Thromb Haemost*, 2008. **99**(5): p. 930-5.
101. Monteagudo M, A.M., Munoz L, et al. Reticulated platelets as a screening test to identify thrombocytopenia aetiology. *QJM* 2008; 101: 549-555.
102. Kurata, Y., et al., *Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycofocalin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia*. *Am J Clin Pathol*, 2001. **115**(5): p. 656-64.
103. Psaila, B., et al., *Intracranial hemorrhage (ICH) in children with immune thrombocytopenia (ITP): study of 40 cases*. *Blood*, 2009. **114**(23): p. 4777-83.
104. Slichter, S.J., et al., *Dose of prophylactic platelet transfusions and prevention of hemorrhage*. *N Engl J Med*, 2010. **362**(7): p. 600-13.
105. Friedmann, A.M., et al., *Do basic laboratory tests or clinical observations predict bleeding in thrombocytopenic oncology patients? A reevaluation of prophylactic platelet transfusions*. *Transfus Med Rev*, 2002. **16**(1): p. 34-45.
106. Panzer, S., et al., *Platelet function to estimate the bleeding risk in autoimmune thrombocytopenia*. *Eur J Clin Invest*, 2007. **37**(10): p. 814-9.
107. Sandes, A.F., et al., *Altered immunophenotypic features of peripheral blood platelets in myelodysplastic syndromes*. *Haematologica*, 2012. **97**(6): p. 895-902.
108. Psaila, B., et al., *Differences in platelet function in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia compared to equally thrombocytopenic patients with immune thrombocytopenia*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(11): p. 2302-10.
109. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(3): p. 231-41.
110. Schoenwaelder, S.M., et al., *Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function*. *Blood*, 2009. **114**(3): p. 663-6.
111. Winkler, J., et al., *Platelet apoptosis in paediatric immune thrombocytopenia is ameliorated by intravenous immunoglobulin*. *Br J Haematol*, 2012. **156**(4): p. 508-15.

112. Mason, K.D., et al., *Programmed anuclear cell death delimits platelet life span*. Cell, 2007. **128**(6): p. 1173-86.
113. Schoenwaelder, S.M., et al., *Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopathy that undermines the hemostatic function of platelets*. Blood, 2011. **118**(6): p. 1663-74.
114. Zeidman, A., et al., *Platelet function and its clinical significance in the myelodysplastic syndromes*. Hematol J, 2004. **5**(3): p. 234-8.
115. Sims, P.J. and T. Wiedmer, *Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 266-75.
116. Bevers EM, C.P., Dekkers DW et al. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. Biochim. Biophys Acta 1999; 1439: 317-330.
117. Heemskerk, J.W., E.M. Bevers, and T. Lindhout, *Platelet activation and blood coagulation*. Thromb Haemost, 2002. **88**(2): p. 186-93.
118. Sewify, E.M., et al., *Increased circulating red cell microparticles (RMP) and platelet microparticles (PMP) in immune thrombocytopenic purpura*. Thromb Res, 2013. **131**(2): p. e59-63.
119. Bouchard, B.A., et al., *Platelets do not express the oxidized or reduced forms of tissue factor*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(3): p. 1188-93.
120. Bouchard, B.A., K.G. Mann, and S. Butenas, *No evidence for tissue factor on platelets*. Blood, 2010. **116**(5): p. 854-5.
121. Jy, W., et al., *Red cell-derived microparticles (RMP) as haemostatic agent*. Thromb Haemost, 2013. **110**(4): p. 751-60.
122. Norgaard, M., *Thrombosis in patients with primary chronic immune thrombocytopenia*. Thromb Res, 2012. **130 Suppl 1**: p. S74-5.
123. Panzer, S., et al., *Agonist-inducible platelet activation in chronic idiopathic autoimmune thrombocytopenia*. Eur J Haematol, 2007. **79**(3): p. 198-204.
124. Harker, L.A., et al., *Dose-response effects of pegylated human megakaryocyte growth and development factor on platelet production and function in nonhuman primates*. Blood, 1996. **88**(2): p. 511-21.
125. Peng, J., et al., *Relative reactivity of platelets from thrombopoietin- and interleukin-6-treated dogs*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4158-63.
126. Harker, L.A., *Platelets in thrombotic disorders: quantitative and qualitative platelet disorders predisposing to arterial thrombosis*. Semin Hematol, 1998. **35**(3): p. 241-52.
127. Jenkins, J.M., et al., *Phase 1 clinical study of eltrombopag, an oral, nonpeptide thrombopoietin receptor agonist*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4739-41.
128. Psaila, B., et al., *In vivo effects of eltrombopag on platelet function in immune thrombocytopenia: no evidence of platelet activation*. Blood, 2012. **119**(17): p. 4066-72.

129. Cheng, G., et al., *Eltrombopag for management of chronic immune thrombocytopenia (RAISE): a 6-month, randomised, phase 3 study*. Lancet, 2011. **377**(9763): p. 393-402.
130. Kuter, D.J., et al., *Romiplostim or standard of care in patients with immune thrombocytopenia*. N Engl J Med, 2010. **363**(20): p. 1889-99.
131. Ghanima, W., et al., *Venous thromboembolism and coagulation activity in patients with immune thrombocytopenia treated with thrombopoietin receptor agonists*. Br J Haematol, 2012. **158**(6): p. 811-4.
132. Dielis, A.W., et al., *Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(1): p. 125-31.
133. Gu, D., et al., *Raised expression of APRIL in Chinese patients with immune thrombocytopenia and its clinical implications*. Autoimmunity, 2009. **42**(8): p. 692-8.
134. Li, M.O., S. Sanjabi, and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 455-71.





## **9. PUBLICACIONES**







# Diploma

a favor de

**M<sup>a</sup> TERESA ÁLVAREZ ROMÁN**

***GANADORA DE LA BECA DE INVESTIGACIÓN  
FMHH 2011***

*Madrid, 8 de abril de 2011*

**Actividad acreditada en base a la encomienda de gestión concedida por  
los Ministerios de Sanidad, Política Social e Igualdad y de Educación  
al Consejo General de Colegios Oficiales de Médicos.**

**Créditos: 2,2, equivalentes a 13,5 horas lectivas**

**Dra. Ana Villegas Martínez**  
Presidenta de la AMHH

**Dra. Florinda Gilsanz**  
Presidente del Congreso







## **XXX CONGRESO NACIONAL SETH**

**Madrid, 6 a 8 de noviembre de 2014**

La FUNDACION ESPAÑOLA DE TROMBOSIS Y HEMOSTASIA con la colaboración de IZASA, S.A., entrega el Premio al mejor artículo publicado sobre Trombosis y Hemostasia, titulado :

**“Effects of Thrombopoietin Receptor Agonists on Procoagulant State in Patients with Immune Thrombocytopenia”**

De los autores:

M<sup>a</sup> Teresa Álvarez Román, Ihosvany Fernández Bello, Elena G. Arias-Salgado, M<sup>a</sup> Isabel Rivas Pollmar, Víctor Jiménez Yuste, Mónica Martín Salces y Nora Butta